

· 实验研究 ·

右美托咪定对丙泊酚诱导新生大鼠大脑发育的远期影响

陈佳林 周丽芳 韦祎 陈静 谢玉波

【摘要】 目的 探讨右美托咪定对丙泊酚诱导新生大鼠大脑发育的远期影响。**方法** SD 大鼠 35 只,雌雄不拘,7 日龄,体重 10~15 g,采用随机数字表法随机分为七组:生理盐水组(N 组)、脂肪乳剂组(F 组)、丙泊酚 100 mg/kg 组(P 组)、右美托咪定 75 μ g/kg 组(D 组)、右美托咪定 25 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD25 组)、右美托咪定 50 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD50 组)、右美托咪定 75 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD75 组),每组 5 只。各组新生大鼠按相应给药方案处理。待大鼠苏醒后放回笼中继续饲养至 9 周时,采用 Morris 水迷宫实验测定大鼠空间学习记忆能力;水迷宫实验结束后,断头取脑,制作脑组织切片,采用 TUNEL 法检测海马神经细胞凋亡情况,免疫组织化学法检测海马突触后致密蛋白 95(PSD95)含量。**结果** 与 N 组比较, P 组、PD25 组和 PD50 组逃避潜伏期明显延长,穿越原平台位置次数明显减少,海马神经细胞凋亡率明显升高,海马 PSD95 含量明显降低($P<0.05$)。与 P 组比较, PD50 组、PD75 组逃避潜伏期明显缩短,穿越原平台位置次数明显增加,海马神经细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);PD75 组海马 PSD95 含量明显升高($P<0.05$)。与 PD25 组比较, PD50 组和 PD75 组逃避潜伏期明显缩短,穿越原平台位置次数明显增加,海马神经细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);PD75 组海马 PSD95 含量明显升高($P<0.05$)。与 PD50 组比较, PD75 组海马神经细胞凋亡率明显降低,海马 PSD95 含量明显升高($P<0.05$)。**结论** 应用右美托咪定 50、75 μ g/kg 预处理可以减轻丙泊酚诱导新生大鼠成年后认知功能障碍,部分机制可能是通过减轻海马神经细胞凋亡和上调 PSD95 基因的表达;未见右美托咪定对发育期大脑有神经毒性。

【关键词】 新生大鼠;右美托咪定;丙泊酚;海马;凋亡;认知功能

Long-term effects of dexmedetomidine on the brain development in propofol-induced neonatal rats

CHEN Jialing, ZHOU Lifang, WEI Yi, CHEN Jing, XIE Yubo. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: XIE Yubo, Email: 1157817791@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the long-term effects of dexmedetomidine on the brain development in propofol-induced neonatal rats. **Methods** Thirty-five seven-day-old Sprague-Dawley rats of both genders, weighing 10-15 g, were randomly divided into seven groups ($n=5$) using a random number table: normal saline group (group N), intralipid group (group F), propofol 100 mg/kg group (group P), dexmedetomidine 75 μ g/kg (group D), dexmedetomidine 25 μ g/kg, 50 μ g/kg and 75 μ g/kg+propofol 100 mg/kg groups (groups PD25, PD50 and PD75), neonatal rats in each group were treated according to the corresponding dosing regimen. After fully awake, the rats were allowed to mature until postnatal week 9 and the spatial learning and memory capacities were tested by Morris water maze. The rats were sacrificed after the tests. Brain was sliced for determination of hippocampal apoptosis by TUNEL assays and the expression of postsynaptic density protein 95 (PSD95) by immunohistochemistry. **Results** Compared with group N, the escape latency was significantly prolonged, the times of platform crossing were significantly decreased, the hippocampal apoptosis ratio was significantly increased and the expression of PSD95 was significantly down-regulated in groups P, PD25 and PD50 ($P<0.05$). Compared with group P, the escape latency was significantly shortened, the times of platform crossing were significantly increased and the hippocampal apoptosis were significantly decreased in groups PD50 and PD75 ($P<0.05$), the expression of PSD95 was up-regulated in group PD75 ($P<0.05$). Compared with group PD25, the escape latency was significantly shortened,

DOI:10.12089/jca.2018.02.015

基金项目: 国家自然科学基金(81373498,81060277);广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1355005-4-2)

作者单位: 530021 南宁市, 广西医科大学第一附属医院麻醉科

通信作者: 谢玉波, Email: 1157817791@qq.com

the number of platform crossing was significantly increased and the hippocampal apoptosis were significantly decreased in groups PD50 and PD75 ($P < 0.05$), the expression of PSD95 was significantly up-regulated in group PD75 ($P < 0.05$). Compared with group PD50, the hippocampal apoptosis were significantly decreased, the expression of PSD95 was significantly up-regulated in group PD75 ($P < 0.05$). **Conclusion** The addition of dexmedetomidine 50, 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ attenuates propofol-induced neurocognitive impairment in neonatal rats after adulthood, partially by attenuating hippocampal apoptosis and up-regulating the expression of PSD95. Dexmedetomidine alone was not neurotoxic to the developing brain.

【Key words】 Neonatal rats; Dexmedetomidine; Propofol; Hippocampus; Apoptosis; Cognitive function

丙泊酚是常用的静脉麻醉药,主要作用是激动突触后的 GABA_A 受体和抑制 NMDA 受体功能^[1]。有研究表明,丙泊酚具有神经毒性,可导致大鼠发育期大脑神经元凋亡,损害大鼠远期的空间学习记忆功能^[2]。右美托咪定是一种高选择性 α_2 肾上腺素受体激动药,具有镇痛、镇静、抑制交感神经活动等特点。有研究表明,右美托咪定预处理能够提供神经保护作用,减轻丙泊酚引起的发育期大脑海马细胞凋亡和认知功能障碍^[3]。本研究观察右美托咪定对丙泊酚麻醉新生大鼠大脑发育的远期影响,为麻醉用药提供依据。

材料与方法

实验动物与分组 健康 SD 大鼠 35 只,雌雄不拘,7 日龄,体重 10~15 g,由广西医科大学动物中心提供。采用随机数字表法将大鼠分为七组:生理盐水组(N 组)、脂肪乳剂组(F 组)、丙泊酚 100 mg/kg 组(P 组)、右美托咪定 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D 组)、丙泊酚 100 mg/kg 复合右美托咪定 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(PD25 组)、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(PD50 组)、75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(PD75 组),每组 5 只。

实验方法 N 组、F 组和 D 组分别腹腔注射生理盐水 100 μl 、脂肪乳剂 100 μl 、右美托咪定 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$;P 组首次腹腔注射丙泊酚(批号:1701022) 50 mg/kg,待大鼠翻正反射恢复时(约 40~60 min),再追加丙泊酚 50 mg/kg,总量为 100 mg/kg^[4];PD25 组、PD50 组和 PD75 组分别先腹腔注射右美托咪定(批号:16122932) 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、75 $\mu\text{g}/\text{kg}$,30 min 后再给予丙泊酚 50 mg/kg,待大鼠翻正反射恢复时再追加丙泊酚 50 mg/kg。大鼠苏醒后放回笼中继续饲养至 9 周,进行以下实验。

大鼠认知功能测定 每组取 5 只大鼠,采用 Morris 水迷宫实验测定大鼠空间学习记忆能力。定位航行实验:历时 4 d,每天每只大鼠连续训练 4 次,每只大鼠随机从 4 个象限的中点面壁式入水,

系统自动记录大鼠 90 s 内找到平台的时间,即逃避潜伏期。若 90 s 内未寻到平台,则将逃避潜伏期记作 90 s,取 4 次的平均值为当日的学习成绩;以第 4 天的逃避潜伏期反映其学习能力。空间探索实验:在第 5 天完成,将平台撤除,选取与平台所在区域相对象限的中点作为入水点,记录大鼠 90 s 内穿越原平台区的次数。

石蜡切片制作 水迷宫实验结束后,每组 5 只大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 3.5 ml/kg,经左心室灌注生理盐水 250 ml,再灌注 4%多聚甲醛 250 ml。断头取脑,4%多聚甲醛固定后石蜡包埋,制成 4 μm 厚的脑切片,用于 TUNEL 和免疫组织化学检测。

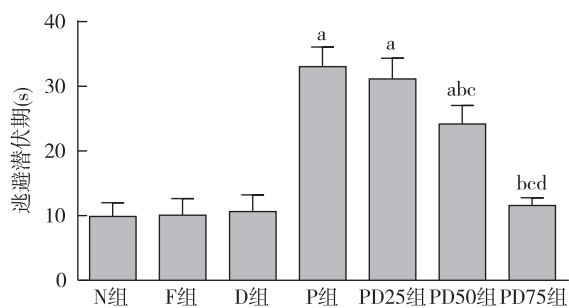
海马神经细胞凋亡率检测 每只大鼠取 3 张石蜡切片脱蜡;水化;蛋白酶 K 37℃ 孵育,滴加 TUNEL 反应混合液 37℃ 孵育 1 h;滴加 DAPI 染色液染核封片;荧光显微镜观察。每张切片随机选取 4 个视野,使用 Image-Pro Plus 软件进行光密度分析,结果以平均光密度(mean optical density, MOD)值表示,MOD 值 = 累积光密度值 ÷ 面积。

海马突触后致密物 95 (postsynaptic density, PSD95) 蛋白含量的检测 每只大鼠取 3 张石蜡切片脱蜡;水化;抗原修复,3% H_2O_2 孵育;室温正常山羊血清封闭,滴加一抗(PSD95 1:500)4℃ 孵育过夜;清洗;滴加二抗 37℃ 孵育 30 min;滴加辣根过氧化物酶;滴加 DAB 显色液;苏木素复染;清洗;脱水;封片。400 倍镜下拍照,棕褐色颗粒为 PSD95 表达阳性。使用 Image-Pro Plus 软件进行光密度分析,以积分光密度值(integrated optical density, IOD)表示 PSD95 蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 22.0 软件进行分析。正态分布计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,定位航行实验结果组间比较采用双因素重复测量方差分析;剩余的数据组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

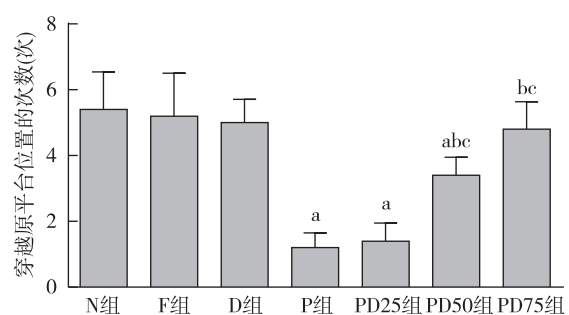
结 果

学习记忆能力 与 N 组比较, P 组、PD25 组和 PD50 组逃避潜伏期明显延长, 穿越原平台位置次数明显减少 ($P < 0.05$); N 组、F 组、D 组、PD75 组逃避潜伏期和穿越原平台位置次数差异无统计学意义。与 P 组比较, PD50 组和 PD75 组逃避潜伏期明显缩短, 穿越原平台位置次数明显增加 ($P < 0.05$); P 组、PD25 组逃避潜伏期和穿越原平台位置次数差异无统计学意义。与 PD50 组比较, PD75 组逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$) (图 1, 2)。



注: 与 N 组比较, $^aP < 0.05$; 与 P 组比较, $^bP < 0.05$; 与 PD25 组比较, $^cP < 0.05$; 与 PD50 组比较, $^dP < 0.05$

图 1 七组大鼠第 4 天逃避潜伏期的比较

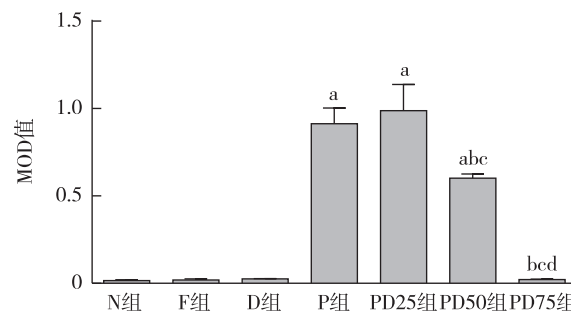


注: 与 N 组比较, $^aP < 0.05$; 与 P 组比较, $^bP < 0.05$; 与 PD25 组比较, $^cP < 0.05$; 与 PD50 组比较, $^dP < 0.05$

图 2 七组大鼠穿越原平台位置次数的比较

海马神经细胞凋亡率 与 N 组比较, P 组、PD25 组和 PD50 组海马神经细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); N 组、F 组、D 组、PD75 组海马神经细胞凋亡率差异无统计学意义。与 P 组比较, PD50 组和 PD75 组海马神经细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$); P 组和 PD25 组海马神经细胞凋亡率差异无统计学意义。与 PD50 组比较, PD75 组海马神经细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

海马组织 PSD95 蛋白含量 与 N 组比较, P



注: 与 N 组比较, $^aP < 0.05$; 与 P 组比较, $^bP < 0.05$; 与 PD25 组比较, $^cP < 0.05$; 与 PD50 组比较, $^dP < 0.05$

图 3 七组大鼠海马神经细胞凋亡率的比较

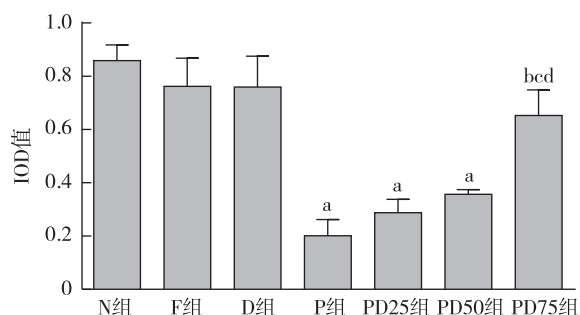
组、PD25 组和 PD50 组海马 PSD95 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$); N 组、F 组、D 组、PD75 组海马 PSD95 蛋白含量差异无统计学意义。与 P 组比较, PD75 组海马 PSD95 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$); P 组、PD25 组、PD50 组海马 PSD95 蛋白含量差异无统计学意义; 与 PD50 组比较, PD75 组海马 PSD95 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$) (图 4)。

讨 论

腹腔注射丙泊酚 ≥ 50 mg/kg 会诱导大鼠发育期大脑神经元凋亡^[5], 故选择丙泊酚 100 mg/kg。参照文献^[6]选用右美托咪定 25、50、75 μ g/kg。7 日龄大鼠右美托咪定催眠半数有效剂量为 0.6 ~ 1.0 μ g/kg^[7], 右美托咪定 75 μ g/kg 是催眠半数有效剂量的 75 倍^[8], 故认为右美托咪定 75 μ g/kg 对于大鼠来说属于高剂量。

本研究结果显示, 新生大鼠接受丙泊酚会损害其成年后的空间学习记忆能力。海马在学习和记忆方面具有重要的作用。麻醉药物可引起 7 日龄大鼠海马损害, 表现为海马突触功能缺失, 并在成年后出现空间学习记忆损害^[9]。本研究结果显示, 7 日龄大鼠接受丙泊酚 100 mg/kg 诱导后, 海马神经细胞凋亡增加。研究表明, PSD95 在海马和大脑皮质中含量丰富; PSD95 含量的减少和认知功能损害有关^[10]。本研究结果显示, 新生大鼠接受丙泊酚诱导后, 海马 PSD95 含量降低。说明丙泊酚可能通过促进海马神经细胞凋亡, 下调 PSD95 基因的表达, 导致新生大鼠成年后神经认知功能障碍。

Sanders 等^[8]研究表明, 右美托咪定能提供神经保护作用, 可以减轻异氟醚诱导的新生大鼠海马神经细胞凋亡和远期认知功能障碍, 且此保护作用呈剂量依赖性。本研究显示, 7 日龄大鼠使用右美



注:与 N 组比较, ^a $P < 0.05$;与 P 组比较, ^b $P < 0.05$;与 PD25 组比较, ^c $P < 0.05$;与 PD50 组比较, ^d $P < 0.05$

图 4 七组大鼠海马 PSD95 蛋白含量的比较

托咪定 50、75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 预处理后,成年大鼠认知功能障碍明显减轻,海马神经细胞凋亡率明显降低,PSD95 蛋白含量明显升高,本研究还显示,右美托咪定的神经保护作用可能呈剂量依赖性,且右美托咪定本身对发育期的大脑没有神经毒性作用^[8,11]。右美托咪定对海马 PSD95 含量可能呈剂量依赖性,右美托咪定 25、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 两种剂量单独应用对海马 PSD95 表达无影响,但与丙泊酚联合应用时,则上调 PSD95 的表达,减轻丙泊酚诱导致新生大鼠认知功能障碍,提供神经保护作用,与现有的研究结果一致^[12,13]。

总之,应用右美托咪定 50、75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 预处理可以减轻丙泊酚诱导致新生大鼠成年后认知功能障碍,可能与减轻海马神经细胞凋亡和上调 PSD95 基因表达有关;单独应用右美托咪定对发育期的大脑未见神经毒性。

参 考 文 献

- [1] Irifune M, Takarada T, Shimizu Y, et al. Propofol-induced anesthesia in mice is mediated by gamma-aminobutyric acid-A and excitatory amino acid receptors. *Anesth Analg*, 2003, 97(2): 424-429.
- [2] Yu D, Jiang Y, Gao J, et al. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 41-46.
- [3] Wang Y, Wu C, Han B, et al. Dexmedetomidine attenuates repeated propofol exposure-induced hippocampal apoptosis, PI3K/Akt/Gsk-3 β signaling disruption, and juvenile cognitive deficits in neonatal rats. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1): 769-775.
- [4] 唐小曼,覃怡,廖淳杰,等.异丙酚对新生大鼠海马生存素和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 表达的影响. *中华儿科学杂志*, 2012, 50(5): 361-365.
- [5] Cattano D, Young C, Straiko MM, et al. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg*, 2008, 106(6): 1712-1714.
- [6] Li Y, Zeng M, Chen W, et al. Dexmedetomidine reduces isoflurane-induced neuroapoptosis partly by preserving PI3K/Akt pathway in the hippocampus of neonatal rats. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93639.
- [7] Sanders RD, Giombini M, Ma D, et al. Dexmedetomidine exerts dose-dependent age-independent antinociception but age-dependent hypnosis in Fischer rats. *Anesth Analg*, 2005, 100(5): 1295-1302.
- [8] Sanders RD, Xu J, Shu Y, et al. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats. *Anesthesiology*, 2009, 110(5): 1077-1085.
- [9] Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 2003, 23(3): 876-882.
- [10] Whitfield DR, Vallortigara J, Alghamdi A, et al. Assessment of ZnT3 and PSD95 protein levels in Lewy body dementias and Alzheimer's disease: association with cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(12): 2836-2844.
- [11] Duan X, Li Y, Zhou C, et al. Dexmedetomidine provides neuroprotection: impact on ketamine-induced neuroapoptosis in the developing rat brain. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2014, 58(9): 1121-1126.
- [12] Wang X, Zhao B, Li X. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced cognitive impairment through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptosis in aging rat. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 17281-17288.
- [13] Lv J, Ou W, Zou XH, et al. Effect of dexmedetomidine on hippocampal neuron development and BDNF-TrkB signal expression in neonatal rats. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016, 12: 3153-3159.

(收稿日期:2017-04-10)