

· 实验研究 ·

不同浓度七氟醚对老年大鼠海马神经发生和恐惧记忆的影响

景灵 斯妍娜 鲍红光 张媛 曾令清 耿圆

【摘要】 目的 探讨七氟醚对老年大鼠海马神经发生和恐惧记忆的影响。**方法** SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只, 20 月龄, 体重 250~300 g, 采用随机数字表法分为三组: 对照组(C 组)、3% 七氟醚组(LS 组)和 4% 七氟醚组(HS 组), 每组 8 只。C 组吸入空-氧混合气体, LS 组予 3% 七氟醚吸入, HS 组予 4% 七氟醚吸入, 吸入时间均为 3 h。吸毕 24 h 进行条件恐惧实验(场景和声音)检测大鼠恐惧记忆。先进行声音和电流刺激训练, 训练后 2 h 和 24 h 进行场景和声音实验。行为学实验结束后立即处死大鼠, 采集脑组织进行免疫荧光分析海马中 Ki67、NeuN、GFAP 阳性细胞数和形态学变化。**结果** 与 C 组比较, HS 组和 LS 组大鼠 24 h 场景实验僵直时间明显缩短, 海马齿状回中 Ki67、NeuN、GFAP 阳性细胞数明显减少($P < 0.05$)。与 HS 组比较, LS 组大鼠 24 h 场景实验僵直时间明显延长, 齿状回中 Ki67、NeuN、GFAP 阳性细胞数明显增多($P < 0.05$)。C 组大鼠海马齿状回组织结构完整、清晰, 细胞排列整齐有序, LS 组和 HS 组大鼠的海马齿状回均出现细胞排列紊乱, 结构完整性破坏, 且 HS 组破坏更为严重。**结论** 3% 和 4% 七氟醚吸入 3 h 均能抑制老年大鼠海马神经发生, 引起恐惧记忆下降。4% 七氟醚对海马神经发生和恐惧记忆的损伤更重。

【关键词】 七氟醚; 老年; 海马神经发生; 恐惧记忆

Effect of different concentrations of sevoflurane on the neurogenesis and fear memory in the hippocampus of senile rats JING Ling, SI Yanna, BAO Hongguang, ZHANG Yuan, ZENG Lingqing, GENG Yuan. Department of Anesthesiology, The Affiliated Nanjing Hospital Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

Corresponding author: SI Yanna, Email: siyanna@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sevoflurane on hippocampal neurogenesis and fear memory of senile rats. **Methods** Twenty-four SPF healthy male Sprague-Dawley (SD) rats aged 20 months and weighing 250-300 g were randomly divided into three groups: control group (group C), 3% sevoflurane group (group LS) and 4% sevoflurane group (group HS), $n=8$ for each group. The rats in group C inhaled air-oxygen mixed gas. The rats in group LS or HS inhaled 3% or 4% sevoflurane for 3 h, respectively. At time point of 24 h after inhalation, condition fear test (scene test and sound test) was used to detect the fear memory of rats. Rats were sacrificed immediately after behavioral experiments, and brain tissues were collected for immunofluorescence analysis of Ki67, NeuN, GFAP-positive cells and morphological changes in the hippocampus. **Results** Compared with group C, freezing time at 24 h in the context test decreased, and the number of Ki67, NeuN and GFAP-positive cells in hippocampal dentate gyrus decreased in rats of group HS and LS ($P < 0.05$). Compared with group HS, freezing time at 24 h in the context test increased, and the number of Ki67, NeuN and GFAP-positive cells in the dentate gyrus increased in rats of group LS ($P < 0.05$). The dentate gyrus in the hippocampus of rats in group C had intact and clear tissue structure, and the cells were arranged neatly and orderly. In the dentate gyrus of rats in group LS and group HS, the arrangement of cells was chaotic and the structural integrity was destroyed, and the destruction of group HS was more severe. **Conclusion** 3% and 4% sevoflurane inhalation inhibit the hippocampal neurogenesis and induce decline of fear memory in senile rats. The effects of 4% sevoflurane is more severe than 3% sevoflurane.

【Key words】 Sevoflurane; Senile; Hippocampal neurogenesis; Fear memory

DOI:10.12089/jca.2018.07.019

基金项目: 南京市卫生青年人才培养工程(第一层次)(QXR17019); 南京市科技发展计划项目—国际联合研发(201715033)

作者单位: 210006 南京医科大学附属南京医院 南京市第一医院麻醉科

通信作者: 斯妍娜, Email: siyanna@163.com

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是麻醉及手术后较常见的一种中枢神经系统并发症, 主要表现为精神错乱、焦虑、人格的改变和记忆受损。老年患者 POCD 发生率远高于青壮年患者, 尤其是大手术后^[1]。近期研究表明, 吸入 3% 七氟醚 2 h 或 4 h 均可导致老年大鼠认知功能损伤^[2], 但七氟醚致老年认知损伤的机制目前尚不明确。海马神经发生失调在认知功能障碍发生发展中起了重要作用。Fang 等^[3]的实验表明, 2.5% 七氟醚吸入 6 h 可抑制胚胎神经干细胞增殖, 引起新生小鼠学习和记忆能力下降。神经发生机制是否介导七氟醚致老年认知损伤, 目前尚未见文献报道。本研究拟探讨七氟醚对老年大鼠海马神经发生和恐惧记忆的影响。

材料与方法

实验动物与分组 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只, 20 月龄, 体重 250~300 g, 由本院实验动物中心提供。分笼饲养, 室温保持在 20~25℃, 湿度保持 60%~70%, 通风良好, 食水均可自由摄取。所有大鼠禁饮禁食 8 h 后开始吸入七氟醚。采用随机数字表法将大鼠分为三组, 对照组 (C 组)、3% 七氟醚组 (LS 组) 和 4% 七氟醚组 (HS 组), 每组 8 只。C 组吸入空气-氧气混合气体, LS 组予 3% 七氟醚吸入, HS 组予 4% 七氟醚吸入, 吸入时间均为 3 h, 吸毕 6 h 恢复食水供应。

条件恐惧实验 七氟醚吸毕 24 h 进行条件恐惧实验, 具体方法参照文献^[4]。所有大鼠首先进行条件恐惧训练。将大鼠置于 32 cm×25 cm×25 cm 的条件恐惧实验箱中, 在 3 min 的适应探索期后, 给予 3 600 Hz、80 dB 的声音刺激持续 60 s, 紧接着给予 0.75 mA 足部电流刺激持续 1 s, 大鼠继续适应 3 min 后放回饲养笼中。分别于训练后 2 和 24 h 进行场景和声音实验。场景实验: 将大鼠放入相同的环境中 6 min, 记录第 2 个 3 min 内的僵直时间。声音实验: 将大鼠置于不同的环境中 6 min, 第 2 个 3 min 时给予声音刺激但不给予电击刺激, 记录僵直时间。采用 Super Fcs 系统自动记录大鼠在实验箱内的活动状态。

组织采集与免疫荧光 行为学测试结束后 4% 多聚甲醛内灌注后取脑, 免疫荧光法检测大鼠海马齿状回神经干细胞的增殖和分化。具体操作步骤参照文献^[5]。加入 Ki67、GFAP 一抗 (1:100 稀释)、NeuN 一抗 (1:100 稀释) 和相应二抗。采用

Image J 图像分析软件分别分析切片中 1 mm² 视野内 Ki67、NeuN、GFAP 阳性细胞计数。观察各组大鼠海马齿状回免疫荧光图中形态学变化。

统计分析 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理。正态分布计量数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 细胞计数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

与 C 组比较, HS 组和 LS 组大鼠训练后 24 h 场景实验僵直时间明显缩短 ($P < 0.05$); 与 HS 组比较, LS 组大鼠训练后 24 h 场景实验僵直时间明显延长 ($P < 0.05$)。三组大鼠训练后 2 h 场景实验和声音实验、训练后 24 h 声音实验僵直时间差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 三组大鼠不同时点场景实验和声音实验僵直时间的比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

项目	组别	例数	训练后 2 h	训练后 24 h
场景实验	C 组	8	49.3±10.1	44.8±9.2
	LS 组	8	42.5±8.7	27.1±7.3 ^{ab}
	HS 组	8	45.3±9.2	15.8±5.7 ^a
声音实验	C 组	8	113.0±14.2	98.6±14.5
	LS 组	8	108.8±10.4	102.9±15.5
	HS 组	8	105.7±11.4	96.4±18.6

注: 与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HS 组比较, ^b $P < 0.05$

与 C 组比较, HS 组和 LS 组大鼠海马齿状回中 Ki67、NeuN、GFAP 阳性细胞数均明显减少 ($P < 0.05$); 与 HS 组比较, LS 组大鼠海马齿状回 Ki67、NeuN、GFAP 阳性细胞数明显增多 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 三组大鼠单位面积下海马齿状回神经发生情况的比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Ki67 阳性细胞数	GFAP 阳性细胞数	NeuN 阳性细胞数
C 组	8	125±25	405±49	821±126
LS 组	8	83±11 ^{ab}	323±42 ^{ab}	658±82 ^{ab}
HS 组	8	44±8 ^a	201±33 ^a	537±103 ^a

注: 与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HS 组比较, ^b $P < 0.05$

免疫荧光结果显示, C 组大鼠海马齿状回组织结构完整、清晰, 细胞排列整齐有序, LS 组和 HS 组大鼠的海马齿状回均出现细胞排列紊乱, 结构完整性破坏, 且 HS 组破坏更为严重(图 1)。

讨 论

在临床上七氟醚常用于吸入麻醉或与静脉麻醉联合的全身麻醉, 其优点是对血流动力学的影响较小、短效且苏醒快, 因此多用于老年患者手术。研究表明, 临床上七氟醚麻醉能引起老年患者术后认知功能障碍^[6], 而动物实验也已证实吸入 3% 七氟醚 2 h 即可致老年大鼠认知损伤^[2]。条件恐惧实验是一种常用的评估实验动物恐惧记忆能力的行为学实验, 因此本实验采用条件恐惧实验评估大鼠记忆能力。本实验结果显示, LS 组和 HS 组大鼠分别吸入 3% 和 4% 七氟醚 3 h 后, 条件恐惧训练后 24 h 场景实验僵直时间明显缩短, 表现为海马依赖性的认知功能损伤。LS 组大鼠与 HS 组大鼠比较, LS 组大鼠恐惧记忆损伤较轻。

条件恐惧实验是评价啮齿类动物对环境相关

的学习记忆能力的方法^[7]。条件恐惧实验中的场景实验僵直时间可反映大鼠海马依赖的学习记忆能力, 声音实验僵直时间可反映非海马依赖的学习记忆能力^[4]。老年大鼠吸入 3.6% 七氟醚 2 h 后在条件恐惧实验中僵直时间百分比明显降低, 出现认知损伤^[8]。老年大鼠分别吸入 1%、2%、3% 和 4% 七氟醚 6 h 后, 发现 1% 和 2% 七氟醚对大鼠认知功能没有明显影响, 而吸入 3% 和 4% 七氟醚的大鼠出现明显恐惧记忆下降^[9]。因此本研究采用吸入 3% 和 4% 七氟醚的方法研究不同浓度的七氟醚对大鼠恐惧记忆的影响。本研究结果显示, 吸入 3% 和 4% 七氟醚均使大鼠训练后 24 h 场景实验僵直时间明显缩短, 而训练后 2 h 场景实验和声音实验、训练后 24 h 声音实验的僵直时间差异无统计学意义, 显示与海马相关的认知功能下降。本实验结果与以往的文献报道相符, 本研究中吸入 4% 七氟醚的大鼠恐惧记忆损伤更重。

神经发生是神经干细胞不断增殖分裂、产生新的神经元的过程。研究表明, 成年哺乳动物海马中仍存在神经发生。神经元在齿状回中逐渐成熟并

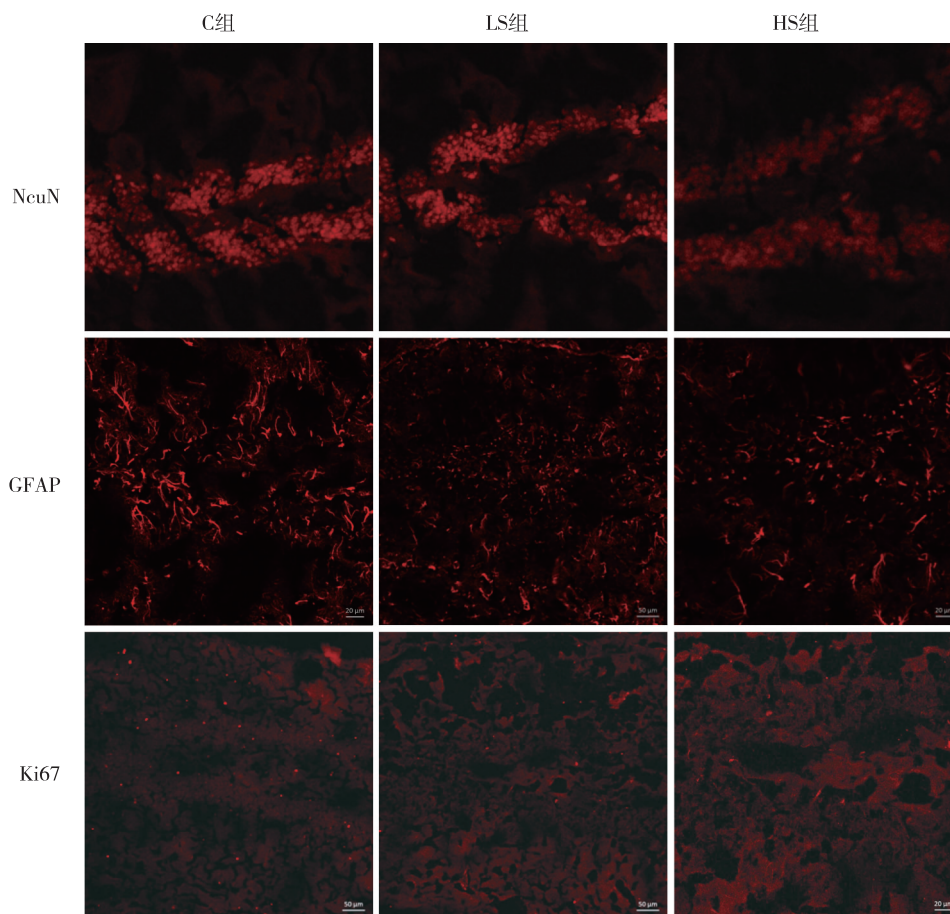


图 1 三组大鼠海马齿状回免疫荧光染色图(×200 倍)

整合到海马,形成神经环路,发挥调节认知功能的作用。脓毒症小鼠海马齿状回中神经干细胞分化减少,成熟神经元凋亡增加,学习能力和空间记忆随之受损^[10]。在 Fang 等^[3]的实验中,孕 14 d 小鼠连续 3 d 每天吸入 2.5% 七氟醚 2 h,出生 31 d 新生小鼠认知功能明显下降;离体培养新生 1 d 小鼠原代海马神经干细胞 10 d 后,以 4.1% 七氟醚处理,连续 3 d,每天 2 h,结果显示 BrdU 阳性细胞数明显减少,神经干细胞增殖受损。然而 Chen 等^[11]发现,与对照组比较,出生 7 d 小鼠吸入 1.2% 七氟醚 6 h 后,于 35~40 d 的认知功能明显提高,海马齿状回 BrdU 阳性细胞数增多;吸入 2.4% 七氟醚 6 h 后,认知功能和海马齿状回神经干细胞增殖与对照组差异无统计学意义。本实验结果显示,吸入七氟醚的老年大鼠海马中 Ki67 标记的神经干细胞数目明显减少,NeuN 标记的成熟神经元和 GFAP 标记的星形胶质细胞数目明显减少,出现神经发生失衡现象,4% 七氟醚所致损伤更重。显示七氟醚导致记忆损伤的原因可能与海马神经发生障碍有关。

Ki67 是一种增殖相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,是目前用来判断细胞增殖能力的主要指标之一。本实验结果显示,吸入 3% 和 4% 七氟醚 3 h 可导致老年大鼠海马齿状回 Ki67 阳性细胞数明显减少,神经干细胞增殖受损。神经干细胞增殖、迁移并分化为成熟神经元,与周围神经细胞形成突触联系,发挥生理功能。神经干细胞增殖的减少将影响海马的正常结构和功能,造成认知损伤。NeuN 是成熟神经元的特异性标记物。本实验中 3% 和 4% 七氟醚可使大鼠海马齿状回 NeuN 阳性细胞数明显减少,神经干细胞发育成熟障碍,并最终导致神经元数量减少。海马中神经元是海马发挥正常功能的基础,神经元数量的减少也是吸入七氟醚引起认知改变的关键因素之一。海马内星形胶质细胞伸展充填在神经细胞的胞体及其突起之间,起支持和分隔神经细胞的作用。GFAP 是星形胶质细胞标记物。大鼠吸入 3% 和 4% 七氟醚后,海马齿状回 GFAP 阳性细胞数明显减少。显示七氟醚抑制神经干细胞向星形胶质细胞分化,使海马神经环路结构紊乱甚至破坏,影响海马正常功能的发挥,引起认知功能障碍。本实验结果显示,正常大鼠海马齿状回组织结构完整、清晰,细胞排列整齐有序,吸入七氟醚大鼠的海马齿状回均出现细胞

排列紊乱,结构完整性破坏,且吸入浓度高七氟醚的大鼠海马齿状回结构破坏更为严重。

综上所述,3% 和 4% 七氟醚吸入 3 h 均能抑制海马齿状回神经发生,表现为神经干细胞增殖减少、分化为星形胶质细胞和神经元成熟障碍,最终引起老年大鼠认知功能损伤。4% 七氟醚对神经发生和认知功能的损伤更重。

参 考 文 献

- [1] Cascella M, Bimonte S. The role of general anesthetics and the mechanisms of hippocampal and extra-hippocampal dysfunctions in the genesis of postoperative cognitive dysfunction. *Neural Regen Res*, 2017, 12(11): 1780-1785.
- [2] 姜静静, 张磊, 林宗航, 等. 七氟醚不同吸入时间对老年大鼠认知功能的影响. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2016, 37(2): 121-125.
- [3] Fang F, Song RX, Ling X, et al. Multiple sevoflurane anesthesia in pregnant mice inhibits neurogenesis of fetal hippocampus via repressing transcription factor Pax6. *Life Sci*, 2017, 175: 16-22.
- [4] 吴晶, 张明强, 贾敏, 等. 线粒体抗氧化肽对脓毒性脑病小鼠认知功能和线粒体功能的影响. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(8): 788-791.
- [5] Jiang BC, Cao DL, Zhang X, et al. CXCL13 drives spinal astrocyte activation and neuropathic pain via CXCR5. *J Clin Invest*, 2016; 126(2): 745-761.
- [6] 季惠, 程志军, 施慧群, 等. 丙泊酚与七氟醚对老年患者术后早期认知功能障碍的影响. *世界临床药物*, 2016, 38(3): 191-195.
- [7] Barnhart CD, Yang D, Lei PJ, et al. Using the morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124521.
- [8] Kashimoto S, Furuya A, Nonaka A, et al. The minimum alveolar concentration of sevoflurane in rats. *Eur J Anaesthesiol*, 1997, 14(4): 359-361.
- [9] 左蕾, 李琪英, 刘丹彦. 不同浓度七氟醚对老年大鼠认知功能的影响. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(3): 239-243.
- [10] Yao B, Zhang LN, Ai YH, et al. Serum S100 β is a better biomarker than neuron-specific enolase for sepsis-associated encephalopathy and determining its prognosis: a prospective and observational study. *Neurochem Res*, 2014, 39(7): 1263-1269.
- [11] Chen X, Zhou X, Yang L, et al. Neonatal exposure to low-dose (1.2%) sevoflurane increases rats' hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity in later life. *Neurotox Res*, 2018.

(收稿日期: 2018-03-27)