

· 实验研究 ·

氯胺酮麻醉及脾切除术对幼年大鼠学习记忆的影响

徐世霞 雷蕾 李菁 夏江燕

【摘要】 目的 观察氯胺酮麻醉及脾切除术对幼年大鼠学习记忆的影响。**方法** 健康幼年雄性 SD 大鼠 30 只, 15 日龄, 体重 29~31 g, 随机分为三组: 生理盐水组(S 组)、氯胺酮组(K 组)、氯胺酮+脾切除组(KS 组), 三组大鼠腹腔分别给予等容量生理盐水 0.3 ml、氯胺酮 100 mg/kg (10 mg/ml)、氯胺酮 100 mg/kg (10 mg/ml), KS 组大鼠氯胺酮麻醉后行脾切除。2 周后三组大鼠进行 Morris 水迷宫实验, 记录逃避潜伏期、Ⅱ象限穿越次数及Ⅱ象限游泳时间。水迷宫实验结束后杀死大鼠, 采用 ELISA 法检测大鼠海马组织谷氨酸(Glu)和 γ -氨基丁酸(GABA)含量。**结果** 与 S 组比较, K 组前 3 d 和 KS 组前 4 d 逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$), K 组和 KS 组Ⅱ象限穿越次数明显减少, Ⅱ象限游泳时间明显缩短($P < 0.05$); 与 K 组比较, KS 组逃避潜伏期明显延长, Ⅱ象限穿越次数明显减少, Ⅱ象限游泳时间明显缩短($P < 0.01$)。与 S 组比较, K 组和 KS 组 Glu 含量明显降低, Glu/GABA 明显减小($P < 0.05$), KS 组 GABA 含量明显升高($P < 0.05$); 与 K 组比较, KS 组 Glu 含量明显降低, Glu/GABA 明显减小($P < 0.05$)。**结论** 氯胺酮麻醉及脾切除均能损伤幼年大鼠的学习记忆功能, 且其记忆功能受损与海马区 Glu 含量及 Glu/GABA 下调有关。氯胺酮对幼年大鼠学习能力的损害只是暂时的, 脾切除能延长并进一步损害幼年大鼠的学习能力。

【关键词】 氯胺酮; 手术; 认知功能; 谷氨酸; γ -氨基丁酸

Effects of ketamine anesthesia and splenectomy on learning and memory of infancy rats XU Shixia, LEI Lei, LI Jing, XIA Jiangyan. Department of Anesthesiology, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: XIA Jiangyan, Email: jiangyanxia731026@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ketamine anesthesia and splenectomy on learning and memory of infancy rats. **Methods** Thirty healthy infancy male SD rats, aged 15 days, weighing 29 - 31 g, were equally randomized into three groups: saline group (group S), ketamine group (group K), ketamine and splenectomy group (group KS). The three groups were administered a same volume of saline 0.3 ml, ketamine 100 mg/kg (10 mg/ml), ketamine 100 mg/kg (10 mg/ml) separately. Rats in group KS carried out the splenectomy after the ketamine anesthesia. Morris water maze test was carried out after 2 weeks of the surgery, and the escape latency, the crossing numbers of the Ⅱ quadrant, as well as the times that rats swimming in the Ⅱ quadrant were recorded. Rats were killed after Morris water maze test, and the concentrations of Glu and GABA in the hippocampus were detected by ELISA test. **Results** Compared with group S, the escape latencies of group K before 3 d and group KS before 4 d were longer ($P < 0.01$). The crossing numbers of the Ⅱ quadrant in group K and group KS were lower, and the swimming times in the Ⅱ quadrant were shorter ($P < 0.05$). Compared with group K, the escape latency was longer, the crossing number, as well as the swimming time in the Ⅱ quadrant were reduced in group KS ($P < 0.01$). Compared with group S, the glutamate concentrations in group K and group KS were lower, Glu/GABA were down-regulated ($P < 0.05$), while the GABA concentration in group KS was increased ($P < 0.05$); Compared with group K, the glutamate concentration in group KS was reduced and Glu/GABA were down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Ketamine anesthesia and splenectomy were both impaired the learning and memory functions of the infancy rats, and the memory dysfunction was related with the changes of the glutamate concentrations and Glu/GABA downregulation in the hippocampus. Ketamine anesthesia impaired the learning function temporally, while the splenectomy pro-

DOI:10.12089/jca.2018.09.016

基金项目: 基础科研扶持项目(3290005411)

作者单位: 210009 南京市, 东南大学附属中大医院麻醉科

通信作者: 夏江燕, Email: jiangyanxia731026@aliyun.com

longed and further impaired the learning function of the infancy rats.

【Key words】 Ketamine; Splenectomy; Cognitive function; Glutamate; γ -aminobutyric acid

氯胺酮在临床上常用于小儿麻醉^[1]。有研究表明,氯胺酮具有神经毒性和记忆损害作用^[2],并可引起认知功能减退^[3]。本研究探讨麻醉和脾切除术对幼年大鼠学习记忆功能的影响及其可能的机制。

材料与方法

实验动物与分组 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,15 日龄,体重 29~31 g,由南京医科大学提供[许可证号:SCXK(苏)2016-0002],饲养于湿度 45%、温度 25℃、12 h 灯照(8:00—20:00)的动物房中,自由摄食、饮水。将大鼠随机分为三组:生理盐水组(S 组)、氯胺酮组(K 组)、氯胺酮+脾切除组(KS 组),每组 10 只。

实验方法 大鼠禁食 12 h,禁饮 6 h。S 组给予等容量生理盐水 0.3 ml;K 组大鼠腹腔给予氯胺酮 100 mg/kg (10 mg/ml);KS 组大鼠腹腔给予氯胺酮 100 mg/kg (10 mg/ml),待角膜反射及翻正反射消失后,参照文献[4]的方法进行大鼠脾切除术。KS 组大鼠仰卧位固定,在肋缘下中线偏左 1 cm 处消毒后做 1.5~2.0 cm 切口,进入腹腔游离脾,在脾蒂根部用 3 号线结扎脾动静脉,完全摘除脾,彻底止血,用 0 号线逐层关腹,术中严格无菌操作,术后常规腹腔注射抗生素青霉素钠(50 U/g,1 次/天),以防止并发感染,待其完全苏醒后放回笼中。麻醉中持续监测 SpO₂ 和 HR,术后恢复 2 周。2 周后三组大鼠进行 Morris 水迷宫实验测试大鼠学习和记忆能力。

水迷宫实验 Morris 水迷宫实验共包括两部分:定向航行实验和空间探索实验。参照文献[5],第 1 天进行适应训练,后续 4 d 进行定向航行实验时,每次将大鼠面向水池壁放入水中,每天训练 4 次,按照 I、II、III、IV 象限的顺序入水进行训练,如果 90 s 之内仍然没有找到平台,就人工将其引领到平台上休息 30 s,结束本次训练,逃避潜伏期计为

90 s。如果大鼠在 90 s 内自行找到平台,则让其在平台上休息 30 s 后结束本次训练。训练过程中计算机全程跟踪,计算逃避潜伏期,并记录水迷宫实验 1、2、3、4 d 的逃避潜伏期。第 6 天进行空间探索实验:撤走平台,选择 IV 象限为入水象限,即平台所在象限的对侧象限,大鼠入水后在水池中自由游泳 90 s,计算机排除行为异常大鼠,每组随机生成轨迹图并记录分析每只大鼠在 90 s 内的游泳路程及速度,计算大鼠 II 象限穿越次数和在 II 象限游泳时间。

海马组织谷氨酸(Glu)和 γ -氨基丁酸(GABA)含量 大鼠行为学测试后,10%水合氯醛 0.3 ml/kg 麻醉,麻醉后进行心脏灌注,然后将大鼠断头取海马组织,称取海马组织重量,按重量体积比加入 9 倍生理盐水制成 10%的组织匀浆,2 500 r/min 离心 10 min,取上清用生理盐水稀释 10 倍后,取样 40 μ l 测定。采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测大鼠海马组织 Glu 和 GABA 含量。在酶标仪上测定 450 nm 处的 OD 值,通过绘制标准曲线,计算大鼠海马组织 Glu 和 GABA 值。

统计分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 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 法;组内不同时点比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

KS 组水迷宫实验第 1、2、3、4 天逃避潜伏期明显长于 S 组,K 组水迷宫实验第 1、2、3 天逃避潜伏期明显长于 S 组($P < 0.01$)(表 1)。

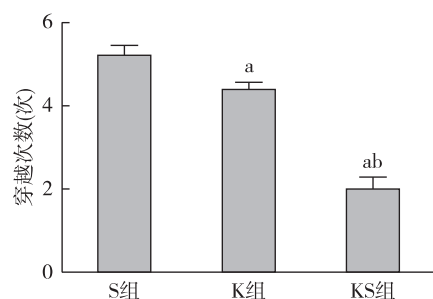
K 组、KS 组 II 象限穿越次数明显少于 S 组,KS 组 II 象限穿越次数明显少于 K 组($P < 0.01$)(图 1)。

K 组、KS 组 II 象限停留时间明显短于 S 组,KS

表 1 三组大鼠水迷宫实验不同时点逃避潜伏期的比较($\bar{x} \pm s$)

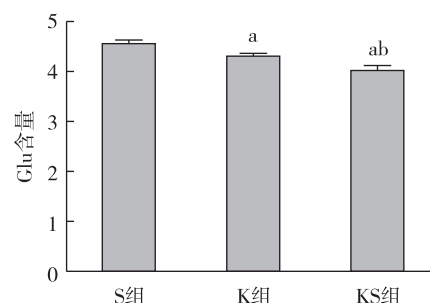
组别	只数	1 d	2 d	3 d	4 d
S 组	10	56.4 $\pm$ 3.8	39.4 $\pm$ 2.6	25.4 $\pm$ 2.7	20.2 $\pm$ 2.9
K 组	10	60.2 $\pm$ 2.2 ^a	45.5 $\pm$ 2.4 ^a	37.7 $\pm$ 2.1 ^a	21.9 $\pm$ 2.1
KS 组	10	70.2 $\pm$ 1.5 ^{ab}	58.5 $\pm$ 1.8 ^{ab}	55.4 $\pm$ 1.1 ^{ab}	57.1 $\pm$ 2.2 ^{ab}

注:与 S 组比较,^a $P < 0.01$;与 K 组比较,^b $P < 0.01$



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 K 组比较,^b $P<0.01$

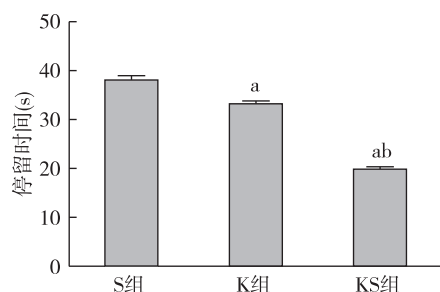
图 1 三组大鼠Ⅱ象限穿越次数的比较



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 K 组比较,^b $P<0.05$

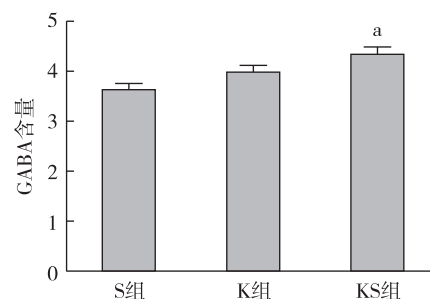
图 4 三组大鼠海马组织 Glu 含量的比较

组Ⅱ象限停留时间明显短于 K 组($P<0.01$)(图 2)。



注:与 S 组比较,^a $P<0.01$;与 K 组比较,^b $P<0.01$

图 2 三组大鼠Ⅱ象限停留时间的比较



注:与 S 组比较,^a $P<0.01$

图 5 三组大鼠海马组织 GABA 含量的比较

与 S 组比较,K 组和 KS 组空间记忆能力下降,KS 组更为严重(图 3)。

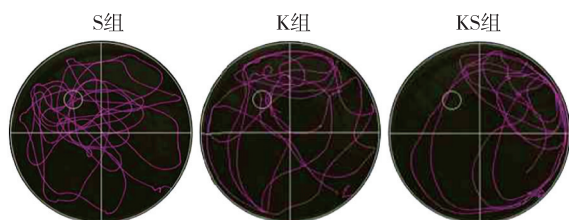
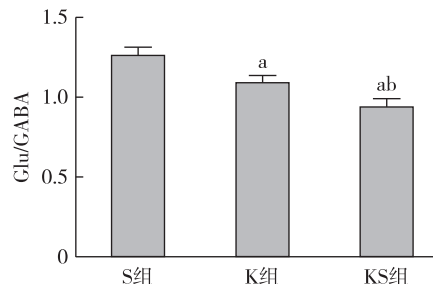


图 3 三组大鼠水迷宫实验行程轨迹图



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 K 组比较,^b $P<0.05$

图 6 三组大鼠海马组织 Glu/GABA 的比较

K 组、KS 组海马组织 Glu 含量明显低于 S 组,KS 组海马组织 Glu 含量明显低于 K 组($P<0.05$)(图 4)。

S 组、K 组海马组织 GABA 含量差异无统计学意义;KS 组海马组织 GABA 含量明显高于 S 组($P<0.01$);K 组、KS 组海马组织 GABA 含量差异无统计学意义(图 5)。

K 组、KS 组 Glu/GABA 明显小于 S 组,KS 组 Glu/GABA 明显小于 K 组($P<0.05$)(图 6)。

讨 论

氯胺酮是 N-甲基-D-天门冬氨酸受体非选择性

拮抗剂^[6]。研究发现氯胺酮可引起新生小鼠成年后认知功能减退^[3],且长时间反复给予氯胺酮对初生啮齿类动物具有严重的神经毒性和长期的记忆损害^[2]。脾切除术作为一个中等创伤手术,手术时间约 20~30 min,本研究采用幼年大鼠单次腹腔注射氯胺酮麻醉后行脾切除术,研究氯胺酮麻醉及脾切除术对幼年大鼠学习和记忆功能的影响。有报道称大鼠腹腔注射氯胺酮 100 mg/kg,麻醉时间长达 30 min^[7],能满足脾切除术,因此本实验选择氯胺酮麻醉剂量为 100 mg/kg。

在动物的学习记忆研究中主要采用经典的 Morris 水迷宫实验,其中逃避潜伏期测试动物的学

学习能力,探索实验测试动物的记忆保持能力^[8]。本研究显示,各组大鼠随着训练天数的增加,逃避潜伏期有缩短趋势,说明逐渐产生了学习记忆;与对照大鼠比较,氯胺酮联合脾切除大鼠 4 d 潜伏期均延长,而单纯氯胺酮麻醉大鼠 3 d 逃避潜伏期延长,至第 4 天恢复到正常水平,说明氯胺酮麻醉和手术均对幼年大鼠的学习能力有影响,但氯胺酮麻醉对幼年大鼠学习能力的影响是短暂的,而氯胺酮切脾组幼年大鼠学习能力明显下降,且持续时间较氯胺酮组影响时间长。氯胺酮 100 mg/kg 单次腹腔注射能明显减少幼年大鼠Ⅱ象限穿越次数,缩短Ⅱ象限停留时间,表明单次氯胺酮麻醉能损伤幼年大鼠的记忆功能,而氯胺酮脾切除幼年大鼠较氯胺酮组记忆功能受损更为明显,提示手术加剧了氯胺酮麻醉对记忆功能的损伤。

海马在学习和记忆方面发挥重要作用^[9],而海马突触可塑性的经典模式是长时程增强(long-term potentiation, LTP), LTP 是记忆形成和巩固过程中神经元活动的客观指标^[10],而 Glu 和 GABA 是广泛存在于中枢神经系统的两种神经递质^[11],是形成 LTP 的重要因素^[12]。推测体内 Glu 和 GABA 含量处于一个平衡状态,幼年大鼠学习和记忆功能受损可能与体内 Glu 和 GABA 含量失衡有关,因此本研究检测海马组织 Glu 和 GABA 含量,发现 Glu 及 Glu/GABA 比值在单纯氯胺酮和氯胺酮联合切脾大鼠中明显下降,而后者下降更为明显,由于氯胺酮组大鼠第 4 天学习能力已恢复,提示海马 Glu 和 GABA 含量失衡主要与幼年大鼠记忆功能受损有关。

本研究仍存在许多不足之处。首先,本实验无法设立单纯手术而不麻醉的对照,因此无法分别探讨氯胺酮麻醉和脾切除术对学习和记忆功能影响的关系;其次,本实验未进行多个时间段行为学的监测和实验指标的检测,因此,不能确定氯胺酮麻醉和脾切除术对学习和记忆功能影响的持续时间。后期的研究主要加强多时间段的行为学和指标的监测,通过影响 Glu 和 GABA 含量的药物进行干预,从而为减轻麻醉和手术对记忆和学习功能的损伤提供新视角和新方法。

综上所述,氯胺酮麻醉和脾切除术均能损害幼年大鼠的学习和记忆功能,且记忆功能的受损与 Glu 和 GABA 含量失衡有关,氯胺酮对幼年大鼠学习能力的损害是暂时性的,脾切除能延长并进一步

损害幼年大鼠学习能力。

参 考 文 献

- [1] Jiang XL, Du BX, Chen J, et al. MicroRNA-34a negatively regulates anesthesia-induced hippocampal apoptosis and memory impairment through FGFR1. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6760-6767.
- [2] Huang L, Liu Y, Jin W, et al. Ketamine potentiates hippocampal neurodegeneration and persistent learning and memory impairment through the PKC γ -ERK signaling pathway in the developing brain. *Brain Research*, 2012, 1476: 164-171.
- [3] Fredriksson A, Pontén E, Gordh T, et al. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology*, 2007, 107(3): 427-436.
- [4] 徐静, 万燕杰, 曾因明. 脾切除术对大鼠空间学习记忆能力的影响. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26(2): 144-147.
- [5] Tao J, Cui Y, Duan Y, et al. Puerarin attenuates locomotor and cognitive deficits as well as hippocampal neuronal injury through the PI3K/Akt1/GSK-3 β signaling pathway in an in vivo model of cerebral ischemia. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 106283-106295.
- [6] Sałat K, Siwek A, Starowicz G, et al. Antidepressant-like effects of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in forced swim test: Role of activity at NMDA receptor. *Neuropharmacology*, 2015, 99: 301-307.
- [7] 胡玉红, 恽时锋, 周森妹, 等. 氯胺酮用于大鼠麻醉的效果观察. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(6): 348-350.
- [8] Walsh CM, Booth V, Poe GR. Spatial and reversal learning in the Morris water maze are largely resistant to six hours of REM sleep deprivation following training. *Learn Mem*, 2011, 18(7): 422-434.
- [9] Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(6): 335-346.
- [10] Fontes MM, Guvenek A, Kawaguchi R, et al. Activity-Dependent Regulation of Alternative Cleavage and Polyadenylation During Hippocampal Long-Term Potentiation. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17377.
- [11] Mokrushin AA. Corticotropin-releasing factor-like peptide modifies the AMPA-, NMDA-dependent and GABAB-ergic properties of synaptic transmissions in vitro. *Regul Pept*, 2014, 188: 1-4.
- [12] Planel E, Richter KE, Nolan CE, et al. Anesthesia lead stotau hyper phos-phorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci*, 2007, 27(12): 3090-3097.

(收稿日期:2018-01-31)