

• 实验研究 •

米诺环素对异氟醚麻醉后老年大鼠认知功能和海马炎症反应的影响

洪玉 刘嘉羿 彭书峻

【摘要】 目的 探讨米诺环素预处理对老年大鼠吸入异氟醚后认知功能和海马炎症反应的影响。**方法** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 48 只, 约 20 月龄, 体重 350~400 g, 随机分为 3 组: 生理盐水组(NS 组)、异氟醚组(Iso 组)、米诺环素预给药组(M 组), 每组 16 只。NS 组腹腔注射等容量生理盐水; Iso 组大鼠开始吸入 2.5% 异氟醚 3 min, 随后 1.5% 异氟醚麻醉维持 4 h; M 组于吸入异氟醚前 30 min 腹腔注射米诺环素 50 mg/kg, 余同 Iso 组。所有大鼠麻醉结束后 24 h 立即进行认知功能测试, 包括 Morris 水迷宫和旷场实验测试, 认知功能测试完毕后立即处死大鼠, 取海马组织, 采用 ELISA 法测定大鼠海马 IL-1、IL-6、TNF- α 的浓度。**结果** 与 NS 组比较, Iso 组第 2、3 和 4 天逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$), 第 5 天平台象限停留时间明显缩短、穿越平台象限次数明显减少($P < 0.05$), 第 1、2 和 3 天中心区停留时间明显缩短($P < 0.05$)。与 Iso 组比较, M 组第 2、3 和 4 天逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$), 第 5 天平台象限停留时间明显延长、穿越平台象限次数明显增多($P < 0.05$), 第 1、2 和 3 天中心区停留时间明显延长($P < 0.05$)。与 NS 组比较, Iso 组海马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度明显升高($P < 0.05$), 与 Iso 组比较, M 组海马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度明显降低($P < 0.05$)。NS 组和 M 组不同时点各指标差异无统计学意义。**结论** 米诺环素预处理可减轻异氟醚麻醉所致老年大鼠认知功能障碍, 其机制可能与抑制海马炎症反应有关。

【关键词】 异氟醚; 米诺环素; 老年大鼠; 认知功能; 炎症因子

Effects of minocycline on neurocognitive impairment and hippocampal inflammatory response after isoflurane anesthesia in old rats HONG Yu, LIU Jiayi, PENG Shuling. Department of Anesthesiology, SUN Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China
Corresponding author: LIU Jiayi, Email: 178961893@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of minocycline pretreatment on the learning and memory impairment induced by isoflurane exposure in old mice. **Methods** Forty-eight healthy male SD rats, aged 20 months old, weighing 350-400 g, were randomly divided into three groups: normal sodium group (group NS), Iso group (group Iso), Minocycline pretreatment group (group M); 16 in each group. Group NS was control group, and rats in this group were injected same amount of normal sodium intraperitoneally. While in group Iso, the rats were exposed to 2.5% isoflurane for 3 min to induce anesthesia and then exposed to 1.5% isoflurane for 4 h to maintain anesthesia; while in group M, except minocycline was injected intraperitoneally (per 50 mg/kg) 30 min before isoflurane anesthesia, the rest treatment was the same as in group Iso. Cognitive tests including Morris water maze and Openfield test were carried out 24 h after the isoflurane anesthesia. Rats in each group were sacrificed immediately after the test, and hippocampi were harvested to determine the expression of inflammatory cytokines including IL-6, IL-1 and TNF- α using ELISA. **Results** Compared with group NS, the escape latency of group Iso was significantly prolonged ($P < 0.05$) on the second, the third and the fourth days, the stay time in the platform quadrant was significantly shortened, the number of crossing platform quadrants decreased significantly on the fifth day ($P < 0.05$), and the retention time in the central area of the first, the second and the third day was significantly shortened ($P < 0.05$). Compared with the Iso group, the escape latency was significantly shortened in group M ($P < 0.05$) on the second, the third and the fourth days, on the fifth day platform quadrant time was obviously prolonged, the number of crossing platform quadrants increased significantly ($P < 0.05$), and the retention time in the central area on the first, the second and the third days was obvi-

DOI:10.12089/jca.2018.11.016

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81271223)

作者单位:510120 广州市,中山大学孙逸仙纪念医院麻醉科

通信作者:刘嘉羿, Email:178961893@qq.com

ously prolonged ($P < 0.05$). Compared with group NS, the concentration of IL-1, IL-6 and TNF- α in the hippocampus of group Iso increased significantly ($P < 0.05$). Compared with group Iso, the concentration of IL-1, IL-6 and TNF- α in the hippocampus of group M decreased significantly ($P < 0.05$). There was no significant difference in the indexes between group NS and group M at different time points. **Conclusion** Cognitive dysfunction induced by isoflurane exposure can be reversed by minocycline pretreatment in old rats, which may be associated with the down-regulation of the excessive release of hippocampal cytokines.

【Key words】 Isoflurane; Minocycline; Old rats; Cognitive function; Inflammatory cytokines

研究表明,吸入异氟醚可诱发或加重老龄大鼠认知功能障碍,其机制与海马过度炎症反应相关^[1]。老年患者接受全麻手术日益增加,因此探寻有效预防和治疗异氟醚所致术后认知功能障碍的措施具有重要意义。米诺环素是一种可透过血脑屏障的中枢性抗炎类抗生素,在多种中枢系统疾病中发挥脑保护作用^[2],但其是否能改善异氟醚所致认知功能障碍尚不明确。本实验拟研究米诺环素预给药对异氟醚麻醉后老年大鼠认知功能障碍和海马炎症反应的机制。

材料与方法

实验动物与分组 由中山大学北校区动物实验中心提供健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 48 只,22~24 月龄,体重 350~400 g。按照随机数字表法,将其分为三组:生理盐水组(NS 组)、异氟醚麻醉组(Iso 组)、米诺环素预处理组(M 组)。

实验方法 Iso 麻醉组:开始吸入 2.5% 异氟醚(批号:936245U)3 min,随后吸入 1.5% 异氟醚 4 h; M 组:于吸入异氟醚前 30 min 腹腔注射米诺环素 50 mg/kg,余同 Iso 组; NS 组:与 M 组同时点腹腔注射等容量生理盐水。将 Iso 组与 M 组大鼠一同置于特制的麻醉箱内(麻醉箱有两个侧孔,入孔接麻醉机,出孔接气体浓度监测仪),保留自主呼吸。监测三组大鼠 HR、BP、SpO₂ 和体温。间断取尾动脉血行血气分析,维持 pH、PaO₂ 和 PaCO₂ 在正常范围内。

水迷宫实验和旷场试验 麻醉后分别于每天上午同时点按照文献^[3]的方法进行水迷宫测试,包括(1)定位航行实验:按照 1 至 4 象限的顺序将小鼠头朝池壁轻柔的放入水池中,并记录小鼠 60 s 内从各入水点到找到平台所需的时间,即逃避潜伏期。若小鼠 60 s 内未找到平台则记录逃避潜伏期为 60 s。分别记录第 1、2、3 和 4 天大鼠 4 个象限逃避潜伏期的平均值。(2)空间探索实验:于第 5 天上午撤除平台,将小鼠自第 3 象限放入水池中,记录 60 s 内大鼠平台象限停留时间和穿越平台象限

次数。参照文献^[4]的方法于麻醉后每天下午同一时点进行旷场试验。试验开始时,均将小鼠置于旷场箱的中央,后让其自由活动并记录小鼠 15 min 内中心区停留时间。每次测试完 1 只小鼠,彻底清洁旷场箱,避免干扰。连续测试 3 d,分别记录第 1、2 和 3 天大鼠中心区停留时间。

海马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度的测定 行为学测试结束后即麻醉后第 5 天立即乙醚麻醉大鼠,迅速断头开颅,完整取出海马组织,称重,4℃匀浆,低温 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-80℃保存待测。按 ELISA 试剂盒说明书测定海马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内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

本实验共纳入 48 只大鼠,均完成实验,三组大鼠 HR、BP、SpO₂、体温和血气分析差异均无统计学意义。

与 NS 组比较, Iso 组第 2、3 和 4 天逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$),第 5 天平台象限停留时间明显缩短、穿越平台象限次数明显减少($P < 0.05$)。与 Iso 组比较, M 组第 2、3 和 4 天逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),第 5 天平台象限停留时间明显延长、穿越平台象限次数明显增多($P < 0.05$)。NS 组和 M 组不同时点逃避潜伏期、第 5 天平台象限停留时间和穿越平台象限次数差异无统计学意义(表 1)。

与 NS 组比较, Iso 组第 1、2 和 3 天中心区停留时间明显缩短($P < 0.05$),与 Iso 组比较, M 组第 1、2 和 3 天中心区停留时间明显延长($P < 0.05$), NS 组和 M 组不同时点中心区停留时间差异无统计学意义(表 2)。

与 NS 组比较, Iso 组海马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度明显升高($P < 0.05$),与 Iso 组比较, M 组海

表 1 三组大鼠不同时点 Morris 水迷宫实验结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期(s)				平台象限停留 时间(s)	穿越平台象限 次数(次)
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天		
NS 组	16	47.8±4.7	35.2±4.1	20.8±2.5	13.2±1.1	30.8±2.4	13.9±2.0
Iso 组	16	55.2±5.3	44.3±5.7 ^a	29.5±3.4 ^a	19.9±1.8 ^a	16.4±1.2 ^a	5.5±1.2 ^a
M 组	16	48.8±4.2	36.4±4.2 ^b	21.2±2.8 ^b	14.5±1.3 ^b	31.3±2.6 ^b	14.9±1.8 ^b

注:与 NS 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Iso 组比较, ^b $P < 0.05$

表 2 三组大鼠不同时点中心区停留时间的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 1 天	第 2 天	第 3 天
NS 组	16	71.4±10.2	73.3±11.5	69.4±13.4
Iso 组	16	40.6±5.4 ^a	35.2±4.5 ^a	37.4±6.2 ^a
M 组	16	77.5±12.1 ^b	79.1±13.3 ^b	68.3±12.3 ^b

注:与 NS 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Iso 组比较, ^b $P < 0.05$

马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度明显降低 ($P < 0.05$)。NS 组和 M 组海马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度差异无统计学意义(表 3)。

表 3 三组大鼠海马 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度的比较 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TNF- α	IL-6	IL-1
NS 组	16	5.55±0.45	2.96±0.15	4.02±0.31
Iso 组	16	8.03±0.61 ^a	5.66±0.37 ^a	10.35±0.73 ^a
M 组	16	4.64±0.29 ^b	3.11±0.19 ^b	4.39±0.28 ^b

注:与 NS 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Iso 组比较, ^b $P < 0.05$

讨 论

术后认知功能障碍(POCD)是麻醉术后常见的中枢神经系统并发症,在老年患者中更易发生。22 月龄的大鼠相当于人类中老年期,故本研究选择此龄大鼠,以期探讨异氟醚对老年大鼠认知功能障碍的机制和探究防治方法,同时为临床诊疗提供新思路。有研究表明 1.4%或更高浓度的异氟醚麻醉 4 h 可导致老年啮齿类动物学习记忆功能损伤^[5],故本研究选择该浓度和时间处理老年大鼠。

海马对低氧、低血压异常敏感,可能导致脑功能受损;为了避免上述因素的影响,本研究在麻醉过程对大鼠生理指标,包括 HR、BP、SpO₂、T 和血

气指标进行监测和控制,以排除缺血缺氧对结果的干扰。整个麻醉过程中,保持大鼠鼻唇、趾端肤色保持红润。Morris 水迷宫是应用于脑学习记忆机制研究的一种实验手段,对动物海马区结构受损尤为敏感。其主要的优点包括:能客观地反映实验动物的认知水平;操作简便,数据误差较小^[6]。旷场实验是一种经典评价动物行为学的实验模型,主要反映动物在新环境下的自主行为和探究行为。本研究 Morris 水迷宫和旷场实验结果显示,异氟醚麻醉后的老年大鼠的空间探索能力以及学习记忆能力均较对照组降低,而注射米诺环素和生理盐水老年大鼠差异无统计学意义,显示米诺环素可减轻老年大鼠异氟醚麻醉引发的学习、探索和记忆能力障碍。

本实验结果显示,米诺环素预先给药可减轻异氟醚麻醉后老年大鼠认知功能障碍,其机理可能与减少中枢炎性因子的过度释放有关。研究已证实异氟醚麻醉诱发老龄动物认知功能障碍,其机制与海马促炎性因子过度释放有关,而海马过度炎症反应是产生认知功能损害的重要原因之一。Zhang 等^[7]发现 1.4%异氟醚处理 6 h 后,老龄大鼠海马 GSK-3 β 表达上调;TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 浓度和蛋白含量都明显升高。神经细胞炎性因子(TNF- α 、IL-1 β 等)释放能够导致认知功能减退。炎性因子释放可抑制海马长时程增强(long-term potentiation, LTP),海马突触活性的长时程增强作为突触可塑性的研究模型,被认为是海马学习记忆的关键。另外,IL-1 β 能够激活半胱天冬酶半胱天冬酶-3(caspase-3),从而导致神经元凋亡,可通过 IL-1 β -caspase-3-神经凋亡途径损害认知功能^[8]。本研究参阅多篇文献及根据预实验结果显示米诺环素的推荐使用剂量为 50 mg/kg,金文杰等^[9]发现预先给予小鼠米诺环素 50 mg/kg 可抑制肝切除术后老年大鼠星形胶质细胞的活化。刘九红等^[10]认为

预先给予小鼠米诺环素 50 mg/kg 可减轻临床相关浓度异氟醚所致的大鼠认知功能障碍,其机制与米诺环素减轻异氟醚诱发的大鼠海马神经元凋亡有关。米诺环素是一种广谱四环类抗生素,研究发现其在阿尔兹海默病、帕金森等多种神经系统退行性病中发挥脑保护作用,显示其具有抗凋亡、抗炎等神经保护作用。米诺环素在神经中枢可达到较高浓度,是为数不多的可透过血脑屏障的抗生素之一,因此其能起到中枢性抗炎作用,减少中枢炎性因子的产生从而发挥脑保护作用^[11]。本实验结果亦显示米诺环素预处理组中枢小胶质细胞产生的促炎性细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 的浓度明显降低,米诺环素可抑制相关促炎因子的释放,从而减轻与神经炎症反应相关的神经认知功能障碍。

综上所述,米诺环素预先给药可减轻异氟醚麻醉诱发大鼠认知功能障碍,其作用机制可能是米诺环素降低中枢炎性因子的活性,进而减轻异氟醚麻醉所致的大脑炎症反应。

参 考 文 献

- [1] 曹高亚,吴倍,邢珍,等.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.临床麻醉学杂志,2017,5(33):483-487.
- [2] Kong F, Chen S, Cheng Y, et al. Minocycline attenuates cognitive impairment induced by isoflurane anesthesia in aged rats. PLoS One, 2013, 8(4): e61385.
- [3] DHooge R, De Deyn PP. Applications of the morris water maze in this study of learning and memory. Brain Res Brain Res Rev, 2001, 36 (1): 60-90.
- [4] Mururta-Goyena A, Ortuzar N, Gargiulo PÁ, et al. Short-term exposure to enriched environment in adult rats restores MK-801-induced cognitive deficits and GABAergic interneuron immunoreactivity loss. Mol Neurobiol, 2018, 55 (1): 26-41.
- [5] Culley DJ, Baxter MG, Yukhananov R, et al. Long term impairment of acquisition of a spatial memory task following isoflurane-nitrous oxide anesthesia in rats. Anesthesiology, 2004, 100(2): 309-314.
- [6] 滕培兰,贾敏,李斌,等.海马 RhoA-Rock2 通路在老年小鼠术后认知功能障碍中的作用.临床麻醉学杂志,2018,34 (6): 574-578.
- [7] Zhang Y, Zhen Y, Dong Y, et al. Anesthetic propofol attenuates the isoflurane induced caspase-3 activation and A β oligomerization. PLoS One, 2011, 6 (11): e27019.
- [8] Patanella AK, Zinno M, Quaranta D, et al. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF- α , IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. J Neurosci Res, 2010, 88 (5): 1106-1112.
- [9] 金文杰,祁涛,封洲,等.米诺环素抑制星形胶质细胞活化改善老年小鼠 70% 肝切除手术后远期学习和记忆能力.南京医科大学学报(自然科学版),2014,34(5): 597-602.
- [10] 刘九红,韩端,迟晓慧,等.米诺环素对老年大鼠海马神经元凋亡及认知功能障碍的影响.医药导报,2015,34(10): 1280-1283.
- [11] 王寿平,陈晓彤.米诺环素对氯胺酮慢性暴露致小鼠认知功能障碍的影响.岭南急诊医学杂志,2015,20(4): 262-263, 277.

(收稿日期:2018-06-13)