·实验研究·

丙泊酚对大鼠离体海马 CA1 区场电位的作用

张瑜　王英伟

【摘要】 **目的**　观察临床常用的静脉麻醉药丙泊酚对大鼠离体完整海马 CA1 区场电位不同振荡频段的作用,探讨丙泊酚对海马内部神经环路功能可能产生的影响。**方法**　选择出生后 14~16 d 雄性 SD 大鼠于 4℃条件下进行完整海马的剥离。待孵育 1~2 h 稳定后,移至电生理记录槽。实验根据灌流的丙泊酚浓度不同分为对照组(C 组)、丙泊酚 1 μmol/L 组(P_1组)、丙泊酚 20 μmol/L 组(P_{20}组)、丙泊酚 40 μmol/L 组(P_{40}组)和丙泊酚 80 μmol/L 组(P_{80}组)。C 组不予丙泊酚灌流,为基础值,P_1组、P_{20}组、P_{40}组和 P_{80}组分别给予丙泊酚 1、20、40 和 80 μmol/L 灌流,采用玻璃微电极记录离体完整海马 CA1 区辐射层的场电位信号,进行场电位的功率谱强度分析。将 C 组的基础值设定为 1,分别计算并比较 P_1组、P_{20}组、P_{40}组和 P_{80}组离体完整海马 CA1 区场电位不同振荡频段(δ:1~4 Hz,θ:4~8 Hz,α:8~13 Hz,β:13~30 Hz,γ:30~80 Hz)与 C 组比值。**结果**　与 C 组比较,P_1组场电位 θ 频段明显增强($P<0.05$),γ 频段明显减弱($P<0.05$),P_{20}组、P_{40}组和 P_{80}组场电位不同振荡频段均明显减弱($P<0.05$)。与 P_1组比较,P_{20}组场电位 δ、θ、α、β 频段明显减弱($P<0.05$),P_{40}组和 P_{80}组场电位不同振荡频段均明显减弱($P<0.05$)。与 P_{20}组比较,P_{80}组场电位 δ、θ、α 频段明显减弱($P<0.05$)。与 P_{40}组比较,P_{80}组场电位 δ 频段明显减弱($P<0.05$)。**结论**　除 θ 频段外,丙泊酚对海马 CA1 区场电位的 δ、α、β 和 γ 频段呈现浓度依赖的抑制作用;对于 θ 频段,大于 20 μmol/L 浓度的丙泊酚仍然表现为抑制作用,但在 1 μmol/L 浓度下却表现为增强作用,显示低浓度丙泊酚对海马内部神经环路可能存在兴奋作用。

【关键词】 丙泊酚;离体完整海马;场电位;γ-氨基丁酸 A 型受体

Effect of propofol on the neuronal oscillations in CA1 area of rat intact hippocampus

ZHANG Yu, WANG Yingwei. Department of Anesthesiology, Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: WANG Yingwei, Email: wangyw@perioperative-science.com

【**Abstract**】 **Objective**　To reveal the effect of propofol on hippocampal neuroal circuits, local field potential (LFP) in CA1 region of intact hippocampus in vitro. **Methods**　SD rats aged 14 - 16 days postnatal were anesthetized and decapitated. The hippocampal formation was dissected from brain tissue in 4℃. LFP of hippocampal CA1 stratum radiatum was recorded with glass electrode when the bath was perfused with propofol at 5 different concentrations-control group with no propofol (group C), 1 μmol/L (group P_1), 20 μmol/L(group P_{20}), 40 μmol/L (group P_{40}) and 80 μmol/L (group P_{80}), respectively. The effect of propofol on the LFP power spectrum (δ: 1 - 4 Hz, θ: 4 - 8 Hz, α: 8 - 13 Hz, β: 13 - 30 Hz, γ: 30 - 80 Hz) in CA1 region of intact hippocampus was analyzed. **Results**　Compared with group C, θ oscillation in group P_1 was significantly increased ($P < 0.05$), γ oscillation was significantly decreased ($P < 0.05$), while all oscillations of LFP power spectrum were obviously decreased in groups P_{20}, P_{40} and P_{80}($P < 0.05$). Compared with group P_1, δ, θ, α and β oscillations in group P_{20} were significantly decreased ($P < 0.05$). And all oscillations of LFP power spectrum in groups P_{40} and P_{80} were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group P_{20}, δ、θ、α oscillations in groups P_{40} were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group P_{40}, δ oscillation in group P_{80} was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion**　Propofol has a concentration-dependent inhibitory effect on δ, α, β and γ oscillations of hippocampal CA1. Although propofol at over 20 μmol/L inhibits θ oscillation, propofol at 1 μmol/L enhances θ oscillation, suggesting that propofol at low concentration exhibits exciting effects on the hippocampal internal neural circuits.

DOI:10.12089/jca.2019.05.019
基金项目:国家自然科学基金重点项目(81730031)
作者单位:200040　上海市,复旦大学附属华山医院麻醉科
通信作者:王英伟,Email:wangyw@perioperative-science.com

【Key words】 Propofol; Hippocampus; Local field potential; γ-aminobutyric acid type A receptor

丙泊酚作为一种临床常用的高脂溶性静脉麻醉药,在分子和临床水平上均有深入研究,但丙泊酚对于神经网络,尤其是单个脑区电信号的影响知之甚少。场电位记录用以监测一群神经细胞的整体电位变化[1-2],能够代表局部神经网络的活动状态。上世纪 90 年代,Khalilov 等[3]介绍了一种新颖的离体完整海马组织制备方式。由于保留了海马组织内部的纤维联系和传导通路,即便是在离体环境,海马神经元仍能维持自发放电活动。本研究拟利用该模型观察丙泊酚对海马局部场电位不同振荡频段的影响,探讨丙泊酚影响海马内部神经环路的相关机制,为进一步阐明全身麻醉药的作用机制提供理论依据。

材料与方法

实验动物　本实验研究已通过伦理委员会制定的相关规定(20180213S)。选择出生 14~16 d,体重 30~40 g 的雄性 SD 大鼠,由华东师范大学脑功能基因组学研究所动物中心提供。实验动物光照周期为 12 h,环境温度 19~25 ℃,相对湿度 70%。

离体完整海马制备　在给予实验动物戊巴比妥钠 80 mg/kg 麻醉后快速断头,剥开颅骨,取其全脑并转移至冰冻人工脑脊液中,成分:氯化钠 119 mmol/L、氯化钾 2.5 mmol/L、氯化钙 2.5 mmol/L、硫酸镁 1.3 mmol/L、D-葡萄糖 11 mmol/L、磷酸二氢钠 1 mmol/L、碳酸氢钠 26.2 mmol/L,渗透压 290~300 mOsm/L,pH 7.24~7.26。于 4 ℃条件下,在人工脑脊液浸湿的滤纸上将左侧脑半球与右侧脑半球分离,一半置于人工脑脊液中继续冷冻,另一半置于滤纸上。先将前脑和脑干部分切除,从皮层中分离完整海马,清除海马上残留的血管后置于人工脑脊液中,于室温下孵育。采用相同的方法将另一侧海马取出并置于人工脑脊液中。孵育 1~2 h 后用于实验。采用随机数字表法将大鼠完整海马分为对照组(C 组)、丙泊酚 1 μmol/L 组(P_1组),丙泊酚 20 μmol/L 组(P_{20}组),丙泊酚 40 μmol/L 组(P_{40}组),丙泊酚 80 μmol/L 组(P_{80}组)。

场电位记录　将五组离体完整海马转移至记录槽中并固定。持续灌流含有混合氧气(95% O_2+5% CO_2)的人工脑脊液。稳定后开始记录。应用水平电极拉制仪(MODEL P-97)拉制玻璃微电极,并于电极内注入人工脑脊液,电极入液后阻抗为 3~4 MΩ。在微电极操纵仪的驱动下将玻璃电极缓慢推入海马 CA1 脑区,当记录电极进入到辐射层时,可记录到低频(1Hz 左右)高振幅的场电位振荡。截取记录 C 组开始后 15~20 min 的数据作为基础值,分析场电位信号不同振荡频段的功率谱强度(δ:1~4 Hz,θ:4~8 Hz,α:8~13 Hz,β:13~30 Hz,γ:30~80 Hz)。从第 20 min 开始,P_1组在循环人工脑脊液中加入 1 μmol/L 丙泊酚进行灌流,P_{20}组加入 20 μmol/L 丙泊酚,P_{40}组加入 40 μmol/L 丙泊酚以及P_{80}组加入 80 μmol/L 丙泊酚分别进行灌流,灌流 20 min 后开始洗脱。截取 P_1组、P_{20}组、P_{40}组和 P_{80}组丙泊酚灌流阶段的最后 5 min 数据,进行场电位不同振荡频段的功率谱强度分析,所有数据经标准化处理,将 C 组的基础值设定为 1,通过计算 P_1组、P_{20}组、P_{40}组和 P_{80}组离体完整海马 CA1 区场电位不同振荡频段的功率谱强度与 C 组的比值,比较不同浓度丙泊酚对离体完整海马 CA1 区场电位的影响。

场电位信号采集　放大器采用(Axonpatch 700B),并通过数模转换卡(Digidata1440)进行转换,最终由 Clampex 10.2 软件以 5 kHz 频率进行采集和存储。采集数据通过 NeuroExplorer 软件进行场电位的功率谱分析。

统计分析　所得数据通过 Sigma Stat 3.5 统计学软件进行统计处理。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对丙泊酚处理前后的结果采用配对 t 检验分析,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

离体完整海马 CA1 区场电位记录　本研究中场电位记录位置为海马 CA1 区(图 1)。当记录电极下降到辐射层时,可记录到低频(1 Hz 左右)高振幅的场电位自发振荡。记录开始 5 min 左右,该振荡频率趋于稳定,并可以维持 1 h 以上。

与 C 组比较,P_1组场电位明显增强。随着丙泊酚灌流浓度的递增,对 P_{20}组、P_{40}组、P_{80}组场电位呈现出不同的抑制作用(图 2)。

丙泊酚对离体完整海马 CA1 区场电位的影响　与C 组比较,P_1组场电位 θ 频段明显增强($P<0.05$),γ 频段明显减弱($P<0.05$),P_{20}组、P_{40}组和 P_{80}组场电位不同振荡频段均明显减弱($P<0.05$)。与 P_1组比较,P_{20}组场电位 δ、θ、α、β 频段明显减弱

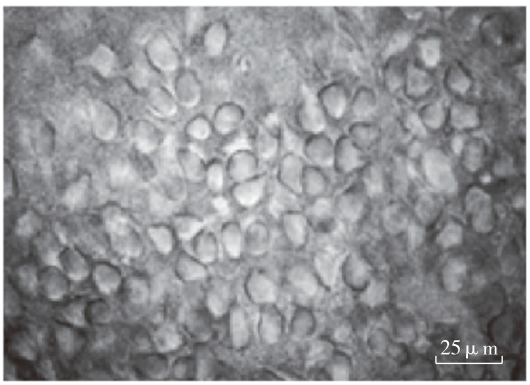

图 1　微分干涉差显微镜下离体完整海马 CA1 区神经细胞层图像(×400)

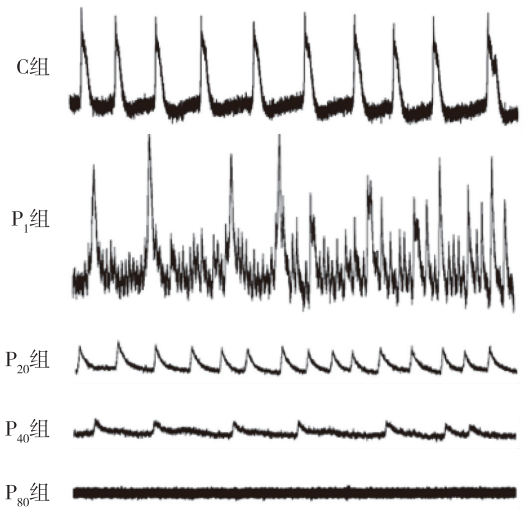

图 2　五组离体完整海马 CA1 区场电位图

($P<0.05$),P_{40}组和 P_{80}组场电位不同振荡频段均明显减弱($P<0.05$)。与 P_{20}组比较,P_{80}组场电位 δ、θ、α 频段明显减弱($P<0.05$),与 P_{40}组比较,P_{80}组场电位 δ 频段明显减弱($P<0.05$)(表 1)。

讨　论

丙泊酚是目前外科手术中使用最为广泛的静脉麻醉药之一。与其他静脉麻醉药如苯二氮䓬类和巴比妥类药物类似,通过激活中枢抑制神经递质 GABA 发挥催眠作用[4-5]。在海马脑片或海马神经元培养等离体实验中,发现丙泊酚可以通过增强 $GABA_A$受体功能发挥抑制作用[6-7]。本实验结果也显示丙泊酚对海马 CA1 区场电位的不同振荡频段影响基本呈现浓度依赖的抑制作用。

然而,临床实践中发现,部分既往无癫痫病史的患者在应用丙泊酚诱导或维持时出现了一系列惊厥样兴奋反应,通常为一过性。丙泊酚的抑制作用依赖于 $GABA_A$受体,而其惊厥样神经兴奋作用的原因目前尚不清楚。有研究表明丙泊酚促惊厥的潜在机制可能与其导致抑制性神经受体和甘氨酸受体脱敏感阻滞有关[8]。同时,丙泊酚脑浓度的变化可能是惊厥样反应的原因之一[9]。本课题组在前期实验中发现,麻醉苏醒期躁动的产生可能与 θ 频段的紊乱有关,并且这种苏醒期躁动行为也伴随癫痫样脑电变化。

海马是中枢神经系统内对癫痫最敏感的脑区之一,癫痫发作可引起 CA1 区、CA3 区、齿状回、梨状皮质区等海马特定区域神经细胞凋亡或坏死[10]。作为边缘系统的一部分,海马在记忆、空间定位和情绪等多种重要脑功能中起到关键作用,其功能的实现与内部神经网络的周期性振荡活动密切相关[11-12]。本实验结果显示 1 μmol/L 的丙泊酚对海马 CA1 区场电位 θ 频段具有明显的增强作用,推测丙泊酚的促惊厥作用可能与此有关。

综上所述,除 θ 频段外,丙泊酚对海马 CA1 区场电位作用呈现浓度依赖的抑制作用;对于 θ 频段,20 μmol/L以上浓度的丙泊酚仍然表现为抑制作用,

表 1　P_1、P_{20}、P_{40}和 P_{80}组离体完整海马 CA1 区场电位不同频段与 C 组比值的比较(%,$\bar{x}\pm s$)

浓度	只数	δ	θ	α	β	γ
C 组	8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
P_1组	10	100.4±18.8	144.6±19.2[a]	79.6±10.9	78.6±27.2	63.2±14.1[a]
P_{20}组	9	29.7±6.4[ab]	4.6±0.9[ab]	7.7±2.3[ab]	10.0±3.5[ab]	26.4±10.0[a]
P_{40}组	9	19.5±5.4[ab]	3.2±0.8[ab]	3.6±1.5[ab]	8.1±3.4[ab]	30.8±10.0[ab]
P_{80}组	8	3.3±1.1[abcd]	1.7±0.9[abc]	0.6±0.1[abc]	2.2±0.8[ab]	13.2±4.0[ab]

注:与 C 组比较,[a]$P<0.05$;与 P_1组比较,[b]$P<0.05$;与 P_{20}组比较,[c]$P<0.05$;与 P_{40}组比较,[d]$P<0.05$

但在 1 μmol/L 浓度下却表现为增强作用,提示低浓度丙泊酚对海马内部神经环路可能存在兴奋作用。

参 考 文 献

[1] Karl J Friston, André M Bastos, Dimitris Pinotsis, et al. LFP and oscillations－what do they tell us? Curr Opin Neurobiol, 2015,31:1-6.

[2] Oscar Herreras. Local field potentials: myths and misunderstandings. Front Neural Circuits, 2016,10:101.

[3] Khalilov I, Esclapez M, Medina I, et al. A novel in vitro preparation: the intact hippocampal formation. Neuron, 1997,19(4):743-749.

[4] Chidambaran V, Costandi A, D´Mello A. Propofol: a review of its role in pediatric anesthesia and sedation. CNS Drugs, 2015, 29(7):543-563.

[5] Vanlersberghe C, Camu F. Propofol. Handb Exp Pharmacol, 2008(182):227-252.

[6] Ishiguro M, Kobayashi S, Matsuyama K, et al. Effects of propofol on IPSCs in CA1 and dentate gyrus cells of rat hippocampus: propofol effects on hippocampal cells' IPSCs. Neurosci Res, 2019, 143: 13-19..

[7] 尚游, 姚尚龙, 江山, 等. 丙泊酚对大鼠海马脑片 CA1 区长时程增强的影响. 临床麻醉学杂志, 2006,22(1):49-51.

[8] 顾娟娟, 杨静, 袁维秀, 等. 丙泊酚中枢麻醉作用机制的研究进展. 海军医学杂志, 2017,38(1):96-98.

[9] Voss LJ, Andersson L, Jadelind A. The general anesthetic propofol induces ictal-like seizure activity in hippocampal mouse brain slices. Springerplus, 2015,4:816.

[10] 欧阳龙强, 杨少春, 邹连生, 等. 黄芩苷对海人酸致痫小鼠海马神经细胞凋亡的影响. 中国神经精神疾病杂志, 2014(05):269-274.

[11] Colgin LL. Rhythms of the hippocampal network. Nat Rev Neurosci, 2016,17(4):239-249.

[12] Igarashi KM. Plasticity in oscillatory coupling between hippocampus and cortex. Curr Opin Neurobiol, 2015,35:163-168.

(收稿日期:2018－10－16)

·读者·作者·编者·

《临床麻醉学杂志》可直接使用缩略语的词汇

美国麻醉医师学会(ASA)
酶联免疫吸附试验(ELISA)
γ-氨基丁酸(GABA)
效应室靶浓度(Ce)
血红蛋白(Hb)
收缩压(SBP)
红细胞计数(RBC)
平均动脉压(MAP)
心肺转流(CPB)
潮气量(V_T)
患者自控硬膜外镇痛(PCEA)
动脉血二氧化碳分压($PaCO_2$)
间歇正压通气(IPPV)
静脉血二氧化碳分压($PvCO_2$)
听觉诱发电位指数(AAI)
四个成串刺激(TOF)
丙氨酸氨基转移酶(ALT)
磁共振成像(MRI)
伊红染色(HE)
聚合酶链反应(PCR)
N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)
血浆靶浓度(Cp)
肿瘤坏死因子(TNF)
血压(BP)
红细胞压积(Hct)
心率与收缩压乘积(RPP)
体重指数(BMI)
脉搏血氧饱和度(SpO_2)
患者自控静脉镇痛(PCIA)
呼气末二氧化碳分压($P_{ET}CO_2$)
呼气末正压(PEEP)
静脉血氧分压(PvO_2)
脑电双频指数(BIS)
重症监护病房(ICU)
天门冬氨酸氨基转移酶(AST)
警觉/镇静状态评定(OAA/S)
羟乙基淀粉(HES)
术后认知功能障碍(POCD)
美国纽约心脏病协会(NYHA)
吸入氧浓度(FiO_2)
白细胞介素(IL)
心率(HR)
血小板(Plt)
舒张压(DBP)
白细胞计数(WBC)
中心静脉压(CVP)
靶控输注(TCI)
呼吸频率(RR)
患者自控镇痛(PCA)
动脉血氧分压(PaO_2)
最低肺泡有效浓度(MAC)
视觉模拟评分法(VAS)
麻醉后恢复室(PACU)
心电图(ECG)
核因子(NF)
计算机断层扫描(CT)
急性呼吸窘迫综合征(ARDS)