多次氯胺酮麻醉对发育早期大鼠空间辨别学习记忆与海马CA1区突触长时程增强的影响*

武云飞,王志萍,江 山,曾因明

(徐州医学院江苏省麻醉医学研究所,江苏 徐州 221002)

摘要:目的 观察分别单次或多次给予发育早期大鼠腹腔注射氯胺酮70 mg·kg^{-1}对大鼠学习记忆的影响。方法 发育早期大鼠70只,随机分为5组。Con1组:大鼠单次腹腔注射生理盐水2 ml。Con2组:大鼠每3天腹腔注射生理盐水2 ml 1次,共5次。Ket1组:大鼠单次腹腔注射氯胺酮70 mg·kg^{-1}。Ket3组:大鼠每3天腹腔注射氯胺酮70 mg·kg^{-1}1次,共3次。Ket5组:大鼠每3天腹腔注射氯胺酮70 mg·kg^{-1}1次,共5次。末次给药7天后,分别运用水迷宫实验(n=8)及电生理海马脑片细胞外记录技术记录海马CA1区突触长时程增强(long-term potentiation,LTP)(n=6),观测发育早期大鼠每3天分别腹腔注射氯胺酮70 mg·kg^{-1}(1、3、5次)7天后对大鼠学习记忆的影响。结果 发育早期大鼠单次或多次氯胺酮70 mg·kg^{-1}腹腔注射7天后,与生理盐水组相比,单次应用氯胺酮后大鼠海马脑片CA1区强直刺激后群峰电位振幅(PSA)与LTP诱发率无显著性差异(P>0.05),但多次用药后强直刺激后PSA与LTP诱发率均明显降低(P<0.01)。而水迷宫实验大鼠达标所需训练次数、逃避潜伏期、进入盲端次数组间无显著性差异(P>0.05)。结论 多次氯胺酮腹腔注射可能引起7天后大鼠学习记忆功能损害,但此学习记忆的损害并不表现为大鼠空间辨别学习记忆功能的损害。

关键词:氯胺酮;术后认知功能障碍;海马;长时程增强;大鼠

中图分类号:R971 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-2065(2005)03-0221-04

Effect of repeated ketamine administration on long-term potentiation (LTP) in area CA1 of hippocampal slices of early developing rats

WU Yun-fei, WANG Zhi-ping, JIANG Shan, et al

(Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of repeated ketamine administration on learning and memory in early developing rats. **Methods** Early developing rats were randomly divided into 5 groups. The rats were administered normal saline 2 ml ip once in group Con1 and 2 ml ip q3d for 5 times in group Con2, while the others were given ketamine 70 mg·kg^{-1} ip once, and q3d for 3 times and 5 times in groups Ket1, Ket3 and Ket5 respectively. Seven days after the last drug injection, behavior and electrical physiological techniques were employed to define the impact of repeated use of ketamine on learning and memory in early developing rats. **Results** Electrophysiology of the hippocampal slice showed repeated ketamine administration in group Ket5 decreased the population spike amplitude (PSA) and the induction rate of LTP (P<0.01). However, repeated ketamine administration did not cause any apparent impairment of spatial learning and memory in the water maze experiment conducted. **Conclusion** Repeated administration of ketamine may impair learning and memory in early developing rats, but this kind of impairment is not exhibited in spatial learning and memory.

Key words: ketamine; postoperative cognitive dysfunction; hippocampus; long-term potentiation; rat

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction,POCD)是指术前无精神异常的患者受围手术期各种因素的影响,术后出现大脑功能活动紊乱,临床表现包括意识、认知、学习、记忆、定向、精神运动行为以及睡眠等方面的紊乱。目前有研究表明发育早期大鼠吸入相当于麻醉浓度的异氟烷、氧化亚氮、氧的混合气吸入并同时联合咪达唑仑麻醉6 h可以引起大鼠持续性空间辨别学习记忆的改变[1],同时有研究发现大鼠发育早期应用氯胺酮可以引起相应神经毒性反应[2,3];但大鼠发育早期应用氯胺

* 作者简介:武云飞(1973-),男,内蒙古包头人,住院医师,在读硕士研究生。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酮是否会引起类似学习记忆功能的持续性损害鲜见相关研究报道。本文以水迷宫实验和海马脑片细胞外记录技术研究给予不同次数麻醉剂量的氯胺酮7天后对发育早期大鼠学习记忆的影响及可能机制。

1 材料和方法

1.1 *实验动物* 实验选用SD大鼠,雌雄不拘(日龄35～45天),各组平均体重和性别比例基本相同,由徐州医学院实验动物中心提供。

1.2 *药物及试剂* ①盐酸氯胺酮注射液,上海生化药业有限公司,产品批号030340;②人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)各成分含量如下(mmol/L):NaCl 124.0,KCl 3.4,KH_2PO_4 1.2,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.7,$NaHCO_3$ 25.0,CaCl 22.4,葡萄糖10.0。所用试剂均为分析纯,以双蒸水配制,通入混合气体(95%O_2和5%CO_2)后pH为7.2～7.4。

1.3 *主要仪器* ①水迷宫,仿中国医学科学院药物所研制;②解剖显微镜,玻璃微电极(南京),刺激器,MEZ－8201微电极放大器(日本),静置－灌流两用界面式浴槽,恒流泵(上海)。

1.4 *动物分组及处理* 随机将动物分为Con1组、Con2组、Ket1组、Ket3组、Ket5组。一部分供行为学实验(n=8),另一部分供电生理实验(n=6)。Con1组大鼠单次腹腔注射生理盐水2 ml,Con2组每3天腹腔注射生理盐水2 ml 1次,共5次,Ket1组大鼠单次腹腔注射氯胺酮70 mg·kg^{-1}(生理盐水稀释至2 ml),Ket3组每3天腹腔注射70 mg·kg^{-1}(生理盐水稀释至2 ml)共3次,Ket5组每3天腹腔注射70 mg·kg^{-1}(生理盐水稀释至2 ml)共5次。所有动物每次给予相应药物处理后立即放入自制的25 cm×8 cm×8 cm有机玻璃箱内,在箱底铺一薄层钠石灰。持续通入纯氧,流量0.5 L/min,待翻正反射恢复后取出吸氧箱。除实验时间外大鼠可以自由摄食及饮水。所有动物末次药物处理7天后,分别行水迷宫实验与大鼠海马脑片细胞外记录。

1.5 *海马脑片细胞外记录技术记录海马CA1区突触长时程增强(LTP)*

1.5.1 脑片制作 所有动物末次药物处理7天后,将大鼠用乙醚麻醉后断头取脑,小心剥离出左侧海马,取中间1/3段,沿海马槽走向连续切成350～400 μm的薄片6～8片,将脑片移至孵育槽内,持续通入混和气,温度维持在28 ℃,孵育90 min后开始实验。实验用静置－灌流两用界面式浴槽,用ACSF以1～15 ml·min^{-1}的速度持续灌流,记录小室温度保持在(33±1)℃。

1.5.2 信号记录 在解剖显微镜下将同心圆电极(刺激电极)置于海马Schaffer侧支纤维处,玻璃微电极(记录电极,电阻4～5 MΩ,内充2 mol·L^{-1} NaCl)置于CA1区锥体细胞层。由刺激器提供单道脉冲刺激,经隔离器输送到刺激电极,输出信号经MEZ－8201微电极放大器、高增益放大器放大后显示在VC10双道记忆示波器上,同时通过X－Y记录仪记录。

1.5.3 实验程序及监测指标 开始实验后先在记录室中观测脑片电反应恢复后开始实验,首先由电子刺激器提供脉冲刺激,刺激海马Schaffer侧支,可在CA1区观测到一群峰电位(population spike,PS),波幅一般为1～5 mV,要求在3.5 mV以上,以保证实验脑片兴奋性。然后用引起PS最大反应50%的强度为测试刺激强度,每隔60 s给予1次刺激。先记录3次正常的群峰电位振幅(population spike amplitude,PSA),将其平均值作为基础值,待PS稳定15～20 min后,在Schaffer侧支上给予高频串刺激(100 Hz,4个脉冲),高频串刺激后每隔5 min记录1次测试刺激引起的PSA,观察记录45 min。每只动物记录3张脑片。本实验观测指标:①PSA:实验中以各时间点PSA与串刺激前3个时间点振幅均值相对值为观测指标。②LTP诱发率:成功诱发LTP的大鼠脑片例数占本组实验大鼠脑片总例数的百分数。LTP诱发成功的判断标准为PS增幅≥30%,维持时间≥30 min。

1.6 *水迷宫空间分辨能力测试* 水迷宫空间分辨能力测试于每天上午8:00～11:00实施。实验装置为100 cm×42 cm×25 cm的茶色玻璃槽,槽右下角为起点,左上角设有安全台。槽内被隔成许多条通路,但只有一条通路能游到安全台,其他通路均为盲端。实验时槽内水深为(20±1) cm ,水温(26±1)℃。测试时将大鼠先放置于终点区让其爬上安全台3次,以适应环境,然后再将大鼠从起点放入,观察其游动路线,从起点开始在120 s内游上安全台为正确,每次大鼠游上安全台让其休息30 s,每次训练以120 s为标准,如游至终点超过120 s以120 s计。连续4次正确到达安全台为学会的标准,每天测试10次,连续测试2天,学会为止,20次训练测试学不会者以20次计。实验时以大鼠达标所需训练次数、逃避潜伏期(从起点到登陆终点安全台需要的时间)及进入盲端的次数衡量大鼠学习记忆的能力。

1.7 *统计学处理* 定量数据均以$\bar{x}\pm s$表示,用成

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

组 t 检验法进行两组间各时点 PSA 相对值均数比较,率的比较用两样本率的 χ^2 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 电生理结果

2.1.1 LTP PSA 相对值降低。两对照组相比,发育早期大鼠腹腔注射不同次数生理盐水 7 天后海马脑片 CA1 区强直刺激后各时间点 LTP PSA 相对值与 LTP 诱发率组间无显著性差异($P>0.05$),说明本实验发育早期大鼠日龄的变化和腹腔注射操作本身并不引起 LTP PSA 相对值的显著性差异。Ket1 组、Ket3 组海马脑片 CA1 区强直刺激后各时间点 LTP PSA 相对值分别低于 Con1 组和 Con2 组,但无显著性差异($P>0.05$)。而 Ket5 组海马脑片 CA1 区强直刺激后 LTP PSA 相对值与 Con1 组、Con2 组相比有明显下降并具有显著性差异($P<0.01$)。结果见图 1。

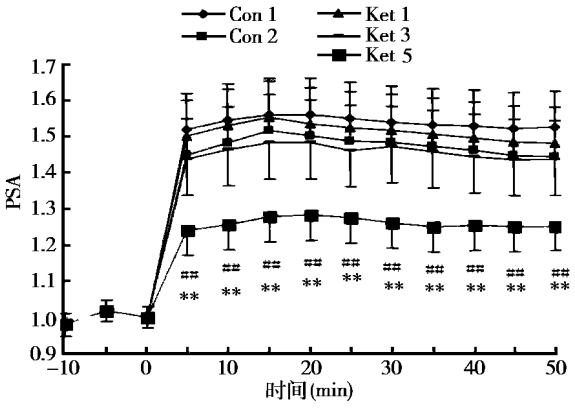

图 1 多次氯胺酮麻醉对发育早期大鼠停药 7 天后 LTP PSA 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

与 Con1 组比较:** $P<0.01$;与 Con2 组比较:## $P<0.01$

2.1.2 Ket3 组 LTP 诱发率与 Con1 组相比有明显下降($P<0.05$),而 Ket5 组海马脑片 CA1 区强直刺激后 LTP 诱发率较 Con1、Con2 组明显降低($P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 多次氯胺酮麻醉对发育早期大鼠停药 7 天后 LTP 诱发率的影响($n=6$)

组别	阳性数	阴性数	阳性率(%)
Con1 组	18	0	100
Con2 组	17	1	94.4
Ket1 组	18	0	100
Ket3 组	14	4	77.8*
Ket5 组	10	8	55.6**##

与 Con1 组比较:* $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 Con2 组比较:## $P<0.01$

2.2 行为学实验结果 发育早期大鼠单次或每 3 天多次腹腔注射麻醉剂量氯胺酮,与对照组相比,7 天后水迷宫训练实验中达标所需训练次数、逃避反应潜伏期和进入盲端错误次数组间无显著性差异($P>0.05$),结果见表 2。

表 2 多次氯胺酮麻醉对发育早期大鼠停药 7 天后水迷宫实验训练次数、逃避反应潜伏期、进入盲端次数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	训练次数(次)	逃避潜伏期(s)	进入盲端次数(次)
Con1	13.3±3.9	1 121±308	124.4±32.5
Con2	12.5±3.5	1 016±283	117.0±28.1
Ket1	13.1±3.2	1 142±309	132.8±29.9
Ket3	12.0±3.3	1 089±292	121.5±28.2
Ket5	11.3±3.2	973±289	114.0±27.8

3 讨 论

LTP 是中枢突触经过突触前纤维的强直(高频)刺激所诱发产生的传递效应的长时间变化,是突触可塑性的表现形式之一,LTP 反映突触水平上的信息存储过程,是学习记忆过程中神经元生理活动的客观指标。研究表明通过药理手段抑制或阻断 LTP 的形成也可以影响学习记忆功能[4],海马 Schaffer 侧支通路与 CA1 区锥体细胞构成的兴奋性通路是 LTP 的主要通路之一[5],发育早期氯胺酮多次使用是否引起 LTP 特性的改变而影响学习记忆功能一直是临床和社会所关注的问题。

本实验以海马脑片细胞外记录技术观测多次腹腔注射氯胺酮对术后学习记忆功能的可能影响,实验结果表明:发育早期大鼠多次腹腔注射麻醉剂量氯胺酮可以使强直刺激后 LTP PSA 相对值与 LTP 诱发率明显降低,而且此作用与药物的多次作用有关。由于本实验所选氯胺酮剂量相当于发育早期大鼠的 ED_{95}(此剂量为预实验中应用分组法所求得),且在预实验中氯胺酮腹腔给药致翻正反射消失后即刻股动脉血气分析均在正常范围之内,实验时有吸氧装置保证大鼠的氧气供应,所以实验结果应该不是过深麻醉所致,而可能与氯胺酮多次给药所致中枢神经毒性反应有关。

发育早期大鼠多次腹腔注射氯胺酮可以抑制海马 CA1 区 LTP 形成的机制目前尚不清楚,值得注意的几点是:①目前普遍认为 NMDA 受体在中枢神经系统发育过程以及调制 LTP 形成过程中起重要作用,神经系统发育包括神经发生、迁移、增殖、神经元的死亡、轴突生长、突触形成和突触消除[6]。从脑功

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

能的角度而言,大鼠 3 月龄以前为发育早期大鼠[7]。而在大鼠发育早期,中枢神经系统 NMDA 受体过度兴奋或过度低下可能有显著而且持续的神经毒性作用[6]。氯胺酮作为 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂,可以通过作用于 NMDA 受体 PCP 结合位点而干扰 NMDA 受体正常功能。②相应形态学研究表明,在 LTP 产生的同时,相应部位的突触后神经元形态学上出现了树突棘增大或数目增多的变化,而有学者认为这种树突棘的形态学变化依赖于 NMDA 受体的兴奋活性[8]。因此,是否多次应用麻醉剂量氯胺酮干扰了海马 CA1 区 NMDA 受体的兴奋活性并影响相应部位树突棘的形态学变化进而影响 LTP 的形成,仍有待进一步研究。

本实验从电生理角度得出的实验结果提示发育早期大鼠多次腹腔注射氯胺酮后可能导致学习记忆功能的持续性损害,而行为学实验结果并没有提示空间辨别学习记忆功能的损害,电生理与行为学实验结果似相矛盾,但近年有学者认为学习记忆功能存在不同的信息加工和提取过程,即事件记忆、语义记忆、程序性记忆、条件性记忆等多种记忆系统[9],与学习记忆之间缺乏明确的量效关系,而空间学习记忆只是多种记忆系统之一,因此这种学习记忆功能的损害行为学上表现为哪种记忆系统的损害以及损害的程度如何都有待进一步研究。

综上所述,本实验发现发育早期大鼠多次腹腔注射氯胺酮 70 mg·kg^{-1}抑制 LTP 的形成,且这种抑制作用与药物的多次应用有关,提示多次应用麻醉剂量氯胺酮可能引起大鼠学习记忆功能的损害。

参考文献:

[1] 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]. J Neurosci, 2003, 23(3): 876—882.

[2] Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain[J]. Science, 1999, 283(5398): 70—74.

[3] Hayashi H, Dikkes P, Soriano SG. Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain[J]. Paediatr Anaesth, 2002, 12(9): 770—774.

[4] 马晓峰,梅镇彤. LTP 是学习和记忆的基础吗? [J]. 生理科学进展, 1998, 29(2): 137—140.

[5] 韩济生,关新民主编. 医用神经生物学[M]. 武汉:武汉出版社, 1996. 232—233.

[6] Haberny KA, Paule MG, Scallet AC, et al. Ontogeny of the N—Methyl—D—aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity[J]. Toxicological Sciences, 2002, 68(1): 9—17.

[7] Hoffmann H, Hunt P, Spear NE. Ontogenetic differences in the association of gustatory and tactile cues with lithium chloride and footshock [J]. Behav Neural Biol, 1990, 53(3): 441—450.

[8] Muller D, Nikonenko I, Jourdain P, et al. LTP, memory and structural plasticity[J]. Curr Mol Med, 2002, 2(7): 605—611.

[9] Ghoneim MM. Drugs and human memory (Part 1): clinical, theoreticam, and methodologic issues[J]. Anesthesiology, 2004, 100(4): 987—1002.

收稿日期:2005—01—11 **修回日期:**2005—05—08

本文编辑:吴 进

不同剂量肾上腺素对抗布比卡因心脏毒性作用的比较*

潘小燕,印洁敏,宋来青,崔恒洁,方 强,武静茹,曹 红,戴体俊

(徐州医学院麻醉学系,江苏 徐州 221002)

摘要:目的 观察不同剂量肾上腺素对抗布比卡因心脏毒性的作用。方法 制作布比卡因致家兔心脏毒性模型,给予不同剂量的肾上腺素,记录心室内压的改变。结果 不同剂量的肾上腺素对抗布比卡因心脏毒性的作用不同,小剂量(0.2 mg)不足以对抗布比卡因心脏毒性,大剂量(0.4 mg)易诱发心率失常,中剂量(0.3 mg)的效果最好。结论 中等剂量肾上腺素具有对抗布比卡因心脏毒性的作用。

关键词:布比卡因;心脏毒性;肾上腺素

中图分类号:R971^{+}.93 **文献标识码:**B **文章编号:**1000—2065(2005)03—0224—03

布比卡因在临床上应用很广,常用量对心血管功能无影响,用量偏大时可以导致血压下降、脉搏缓慢,一旦发生心搏骤停,复苏困难[1,2]。肾上腺素作为强心药,可使血管收缩,提高冠脉循环的血流,增

* **作者简介:**潘小燕(1982—),女,江苏常州人,2001 级在读本科生。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net