

异氟醚麻醉对大鼠海马乙酰胆碱释放昼夜节律的影响

谭红鹰¹, 菊地龙明², 曾维安¹, 林文前¹, 李伟¹, 许梅曦¹

(1. 华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 麻醉科, 广东 广州 510060;

2. 日本横滨市立大学医学院麻醉科, 日本 横滨)

摘要:【目的】本实验旨在探讨异氟醚麻醉对大鼠海马乙酰胆碱(ACh)释放昼夜节律的影响,并比较在暗期及明期麻醉对该节律变化的影响。【方法】采用活体微透析技术,从大鼠海马处连续收集透析液 3 d,并自动注射到高效液相色谱仪中以测定 ACh 浓度。大鼠共分 3 组(每组 6 只):对照组;明期给药组(从 11:00 至 15:00 时予 1.4%异氟醚麻醉);暗期给药组(从 23:00 至 03:00 予 1.4%异氟醚)。所有大鼠放置于明暗周期下喂养(明期 07:00-19:00)。【结果】对照组海马 ACh 呈明显的昼夜节律变化,暗期 ACh 平均值较明期明显增高(173.4%, 185.3% vs. 107.4%, 104.0%, $P < 0.01$);明期给药组,麻醉使第一个明期 ACh 均值减少(94.0% vs. 107.4%, $P < 0.05$);麻醉后 ACh 在暗期及明期的浓度与对照组相比,无显著差异(183.2% vs. 185.3%, 101.4% vs. 104.0%, $P > 0.05$)。暗期给药组,麻醉使第一个暗期 ACh 均值明显减少(136.0% vs. 173.4%, $P < 0.01$);而且麻醉后明期的 ACh 均值较对照组明显增高(125.4% vs. 107.4%, $P < 0.01$),麻醉后暗期 ACh 均值较对照组明显减低(154.2% vs. 185.3%, $P < 0.01$)。【结论】在暗期给予异氟醚麻醉较在明期麻醉对海马 ACh 的昼夜节律影响明显。

关键词: 乙酰胆碱; 海马; 昼夜节律; 微透析; 麻醉

中图分类号: R614 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)06-0758-04

Effect of Isoflurane Anesthesia on Circadian Rhythm of Hippocampal Acetylcholine Release

TAN Hong-ying¹, Kikuchi Tachiaki², ZENG Wei-an¹, LIN Wen-qian¹, LI Wei¹, XU Mei-xi¹

(1. State Key Laboratory of Oncology in South China//Department of Anesthesiology, Cancer Center, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Department of Anesthesiology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of isoflurane anesthesia on the circadian rhythm of hippocampal extracellular acetylcholine (ACh) level in rats and compare this effect of isoflurane anesthesia administered during the light phase and during the dark phase. 【Methods】 Using in vivo microdialysis technique, the dialysate was collected from the hippocampus for 3 d, and was auto-injected into the high performance liquid chromatography, by which ACh concentration was measured. The rats were divided into three groups ($n = 6$ in each group): Group Control; Group Light (1.4% isoflurane was administered from 11:00 to 15:00); Group Dark (1.4% isoflurane was administered from 23:00 to 03:00). All the rats were housed under a light/dark cycle (light phase 07:00-19:00). 【Results】 The hippocampal ACh release showed a clear daily rhythm in Group Control: the mean ACh in the dark phases was higher than those in the light phases (173.4%, 185.3% vs 107.4%, 104.0%, $P < 0.01$). For Group Light, as compared with Group Control, anesthesia made the mean ACh in the first light phase reduce (94.0% vs 107.4%, $P < 0.05$); the mean ACh in the dark phase and light phase after anesthesia did not differ from their correspondents of Group Control (183.2% vs. 185.3%, 101.4% vs. 104.0%, $P > 0.05$). For Group Dark, anesthesia made the mean ACh in the first dark phase reduce greatly (136.0% vs. 173.4%, $P < 0.01$); after anesthesia, compared with Group Control, the mean ACh was increased in the following light phase (125.4% vs 107.4%, $P <$

收稿日期: 2008-03-11

基金项目: 广东省医学科研基金(A2008221)

作者简介: 谭红鹰(1972-),女,广东韶关人,硕士,主治医师, E-mail: redeagletan@163.com

0.01), and decreased in the dark phase (154.2% vs 185.3%, $P < 0.01$). [Conclusion] The influence of isoflurane anesthesia on the hippocampal ACh circadian rhythm was pronounced when administered during the dark phase than those administered during the light phase.

Key words: acetylcholine; hippocampus; circadian rhythm; microdialysis; anesthesia

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2008, 29(6): 758-761, 781]

人类在许多功能活动上表现为昼夜性节律变化,如激素的分泌,睡眠及活动等^[1]。昼夜节律是内源性的节律,由位于下丘脑视上核的中枢整律器所控制,其主要的同步因子是光线^[2]。临床研究显示麻醉、手术后可能会发生某些昼夜节律紊乱,而昼夜节律紊乱可能与术后并发症如睡眠障碍,谵妄及认知功能障碍高度相关^[3]。海马乙酰胆碱(ACh)的释放与认知,学习和记忆功能有关^[4-5],应用微透析技术研究显示大鼠脑内ACh释放呈昼夜节律变化,在暗期(活动期,相当于人类的日间)增加;在明期(休息期)减少^[6]。现有研究显示不少全麻药能抑制脑内结构释放ACh^[7],然而这些实验观察的时间较短,麻醉停止后不久即结束。目前尚不清楚全麻后ACh的昼夜节律是否改变,因此本研究目的应用微透析技术探讨异氟醚麻醉对大鼠海马ACh昼夜节律变化的影响,并比较明期和暗期麻醉对该节律的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物与手术

年轻雄性 Wistar-Imamichi 大鼠 (质量 230 ~ 350 g, 2 ~ 3 月鼠龄) 共 18 只, 在恒温 23°C, 明/暗周期(明期 07:00-19:00 时) 条件下喂养。戊巴比妥钠麻醉下(31.5 mg/kg, i.p.), 应用脑立体定向仪, 根据 Albe-Fessard 图, 坐标为耳棒前 3.1 ~ 3.5 mm, 中线旁 3.0 mm, 脑表面下 2.1 ~ 2.2 mm, 将不锈钢导管(外径, 0.51 mm, AG-8, Eicom Co., 日本) 埋植到背侧海马。术后一周开始微透析实验。

1.2 活体微透析实验

在浅乙醚麻醉下, 取出通管丝, 置入透析探针(AI-8-1, Eicom Co.)。在大鼠无拘束状态下, 应用微透析泵(CMA/102, Carnegie Medicin, 瑞典), 以 1.2 μ L/min 的速率, 通过微透析探针的半透膜(长 1.0 mm), 灌注人工脑脊液(147 mmol/L NaCl; 4 mmol/L KCl; 1.2 mmol/L CaCl₂; 0.9 mmol/L MgCl₂), 灌注液不含胆碱酯酶抑制剂。每 20 min 透析液自动收集到自动注射器内(24 μ L, EAS-20,

Eicom Co.), 并且与等容量的内部标准溶液乙基类胆碱混合。混合液每 20 min 直接注入高效液相色谱仪(HPLC)柱中。共收集 3 d。

取样实验结束后, 大鼠在戊巴比妥钠深麻醉下以 40 g/L 甲醛 50 mL 灌注。用显微镜观察脑固定切片以确定透析探针的位置是否正确。

1.3 动物分组

大鼠随机分为 3 组, 每组 6 例。对照组; 明期给药组: 从 11:00 至 15:00 时给与异氟醚; 暗期给药组: 从 23:00 至 3:00 时给与异氟醚。后两组在给药期间, 于鼠笼内(直径 35 cm, 高 45 cm) 持续充以体积分数为 60% 氮气, 40% 氧气(分别为 3 L/min, 2 L/min) 及 1.4% 异氟醚共 4 h。用麻醉气体监测仪(UIT-S-31-02; Datex Co., 芬兰) 监测异氟醚, 氧气及二氧化碳浓度。

1.4 ACh 的测定

用 HPLC, 酶反应器及电化学检测仪(ECD) 测定 ACh。移动相为 0.1 mmol/L Na₂HPO₄ 溶液, pH 8.5, 含 200 mg/L sodium 1-decanesulfonate; 50 mg/L sodium EDTA, 流速为 150 μ L/min。ACh 被分离柱分离出后, 在酶反应器内被乙酰胆碱酯酶转化为过氧化氢, 再用 ECD 检测过氧化氢。最低检测量为每样本 5 ~ 10 fmol。

1.5 统计分析

以每只大鼠在明期 L0(第一个暗期 D1 之前) 13:00 至 19:00 时 ACh 浓度的平均值作为基础值, 每只大鼠在每个时点测得的 ACh(%) = (每只大鼠在每个时点测得的 ACh 浓度/该只大鼠 ACh 基础值) \times 100%, 数据以均数(标准误)% 来表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 用两因素方差分析, 跟随 LSD 检验, 变量为组别与期别。继之用单因素方差分析, 跟随 LSD 检验同组不同期及同期不同组的差别。P < 0.05 为有统计学意义。

2 结 果

三组大鼠海马细胞外液 ACh 均值的昼夜节律变化如图 1 所示。两因素方差分析显示以下差别

有统计学意义: 组间差别, $F(2, 1720) = 13.82, P = 0.00$; 期间差别, $F(3, 1720) = 238.63, P = 0.000$; 组别与期别之间的相互作用 $F(6, 1720) = 17.74, P = 0.006$ 。单因素方差分析进一步显示: 对照组暗期(D1 及 D2 期)ACh 均值(标准误)与明期(L1 及 L2 期)相比显著增高, $173.4(4.0)\%, 185.3(5.0)\% vs. 107.4(3.3)\%, 104.0(3.5)\%, P = 0.000$ 。明期给药组: 在异氟醚麻醉期间, ACh 最低值平均降至 $28.2(3.0)\%$, 第一个明期(L1) ACh 均值低于对照组, $94.0(3.9)\% vs. 107.4(3.3)\%, P = 0.023$, 在麻醉停止后 ACh 回升至麻醉前水平; 麻醉后暗期(D2), 明期(L2) ACh 均值与对照组相比, 差异无显著性, $183.2(4.3)\% vs. 185.3(4.8)\%, P = 0.762$,

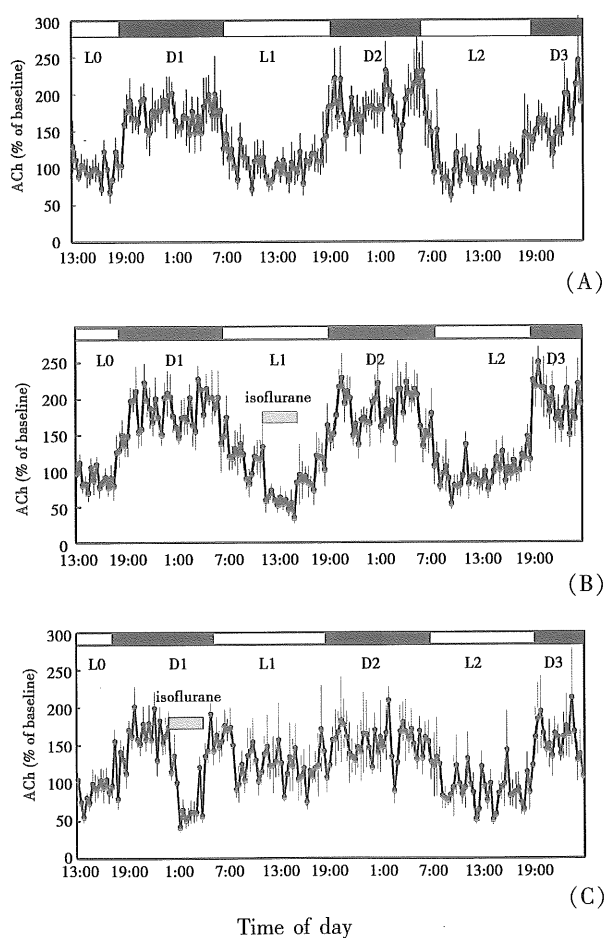


图 1 三组大鼠海马 ACh 释放量随时间的变化

Fig.1 The time course of hippocampal ACh release for the three groups

(A) Group Control; (B) Group Light; (C) Group Dark ($n = 6$ in each group). The data are expressed as percentages of the mean ACh concentration from 13:00 to 19:00 (L0) in each rat. Black bars represent dark phases. White bars represent dark phases. Grey bars represent anesthesia.

$101.4(3.2)\% vs. 104.0(3.5)\%, P = 0.643$ 。暗期给药组: 在异氟醚麻醉期间, ACh 最低值平均降至 $42.4(3.2)\%$, D1 期的 ACh 均值降至 $136.0(4.0)\%$, 明显低于对照组 $173.4(4.0)\%, P = 0.000$; 虽然在麻醉停止后 ACh 回升至麻醉前水平, 但麻醉后明期(L1) ACh 均值增至 $125.4(4.4)\%$, 高于对照组 $107.4(3.3)\%, P = 0.008$; 麻醉后暗期 D2 的 ACh 则明显低于对照组, $154.3(5.2)\% vs. 185.3(4.8)\%, P = 0.000$ (图 2)。

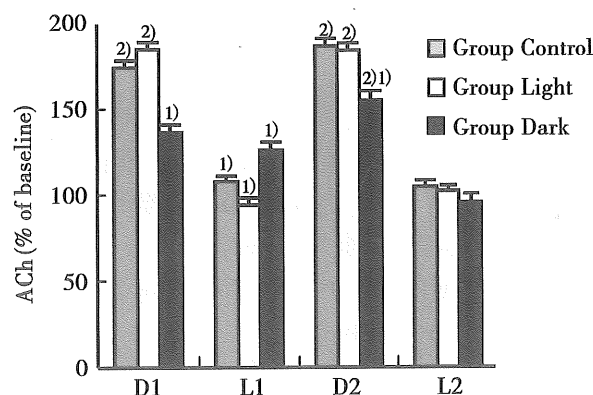


图 2 三组大鼠在四个期内的 ACh 释放量

Fig.2 ACh release for the three groups in the 4 phases

The overall mean \pm SEM was shown; 1) $P < 0.05 vs$ Group Control (comparison within the same phase); 2) $P < 0.05 vs$ L1 and L2 (compared within the same group)

3 讨论

3.1 麻醉后 ACh 昼夜节律的改变

本结果显示对照组大鼠的海马 ACh 释放量在暗期(活动期)增高至 $173.4\% \sim 185.3\%$, 在明期(休息期)降至 $104.0\% \sim 107.4\%$, 呈明显的昼夜节律变化, 这与文献所报道 ACh 释放量在暗期较明期升高约 170% 相符合^[6]。给药组在异氟醚麻醉期间 ACh 均减少, 明期麻醉时, ACh 最低值降至 28.2% , 与 Shichino 等^[7]的研究结果相近; 整个明期(L1) ACh 均值 94.0% , 略低于对照组的 107.4% 。暗期麻醉时, ACh 最低值降至 42% , 整个暗期(D1) ACh 均值降至 136.0% , 明显低于对照组 173.4% 。另外, 与 Shichino 等^[7]的研究不同, 本研究还继续观察了麻醉后 1~2 d 的 ACh 昼夜节律, 发现明期给药组麻醉后 ACh 昼夜节律, 与对照组相比, 无明显差别; 而暗期给药组麻醉后 ACh 昼夜节律则有所改变, 与对照组相比, ACh 在明期释放增加

(125.4% vs. 107.4%), 在暗期减少(154.3% vs. 185.3%)。本结果表明暗期给药组在异氟醚已停止后的1 d,对海马 ACh 的释放昼夜节律仍有影响。

3.2 可能机制

以往认为麻醉药的药效时间不会超过其药理学作用时间,一旦麻醉药被清除后,大脑便恢复回原来的状态,不过近年越来越多的证据表明事实并非如此,全麻可能会造成长久的神经病理学改变。有研究发现吸入异氟醚等麻药后可使大鼠的海马基因表达在麻醉停止后2 d 仍然产生改变^[8];异氟醚等吸入麻醉还增加 β 淀粉样蛋白(A β)生成及寡聚化,增强A β 的细胞毒性,并可引起细胞凋亡^[9]。而最近的研究还显示吸入性麻药七氟醚抑制昼夜节律基因的表达,这种抑制作用从麻醉期间持续至麻醉停止,大鼠苏醒后24 h^[10]。本结果所显示异氟醚对海马 ACh 昼夜节律的影响是否与异氟醚抑制昼夜节律基因表达有关尚需进一步实验确证。

至于分别在明期及暗期给药对 ACh 昼夜节律产生不同影响可能与中枢神经系统对麻醉药的敏感性随昼夜变化有关。研究发现 γ -氨基丁酸能A(GABA)受体的亲和力及突触后受体活性在明期增强^[11]。吸入性麻醉药异氟醚可增强GABA受体对GABA的反应^[12],而GABA亦是下丘脑视上核主要的神经递质,对昼夜节律的产生起重要作用^[13]。靶受体活性的昼夜变化可能导致了异氟醚作用的昼夜差别。此外,近来研究提示麻醉和睡眠可能有着共同的调节机制,麻醉药可能通过激活或模拟内源性睡眠路径的活动而起麻醉作用^[14]。在暗期予异氟醚全麻时,大鼠被迫在清醒期内睡眠,可能干扰了正常的睡眠-清醒周期的产生;而大鼠在明期麻醉时,只是在睡眠期内睡眠,对正常的睡眠-清醒周期干扰可能相对较少。这也可能是导致暗期麻醉比在明期麻醉对 ACh 昼夜节律影响明显的因素。

3.3 临床意义

临床手术麻醉后常出现睡眠质量下降,快速动眼期睡眠(REM)反跳性增多^[15];术后1~3周内发生认知功能障碍。尤其老年患者麻醉手术后较长的一段时期内常发生注意力不集中的情况,10%~15%的老年人术后发生认知功能障碍^[16]。动物实验显示吸入异氟醚等全麻药后可导致大鼠的空间工作记忆保持能力长期缺失,也提示麻醉

后可发生记忆、学习障碍^[17]。现已知ACh是作用于基底前脑及其投射区皮质和海马的神经递质,调节皮层唤醒,记忆、认知及意识等功能^[4]。在慢波睡眠,即深睡眠时,ACh释放减少,在REM时,释放增加^[18]。胆碱能神经元受损时,大鼠海马ACh释放减少,行为学上表现为水迷宫学习障碍,物体识别障碍及记忆缺失^[4]。本研究结果所显示暗期异氟醚全麻后,ACh在睡眠期释放增加,在活动期减少,提示术后睡眠障碍,谵妄和认知功能障碍可能与麻醉后ACh昼夜节律紊乱相关。

总之,本研究采用活体微透析技术显示暗期予异氟醚麻醉较在明期麻醉对大鼠海马ACh释放的昼夜节律影响明显,表现为ACh在麻醉后的明期较对照组增加,在暗期较对照组减少。

参考文献:

- [1] Chassard D, Bruguerolle B. Chronobiology and Anesthesia [J]. *Anesthesiology*, 2004, 100 (2):413-427.
- [2] Van Esseveldt KE, Lehman MN, Boer GJ. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 33(1):34-77.
- [3] Rasmussen LS, O'Brien JT, Silverstein JH, et al. ISPOCD2 Investigators. Is peri-operative cortisol secretion related to post-operative cognitive dysfunction? [J] *Acta Anaesthesiol Scand*, 2005, 49(9):1225-1231.
- [4] Pepeu G, Giovannini MG. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes [J]. *Learn Mem*, 2004, 11(1):21-27.
- [5] 邹飞,高天明,陈培熹. 海马神经元乙酰胆碱受体通道的动力学特性[J]. *中山医科大学学报*, 1994, 15(2):86-90.
- [6] Mizuno T, Endo Y, Arita J, et al. Acetylcholine release in the rat hippocampus as measured by the microdialysis method correlates with motor activity and exhibits a diurnal variation [J]. *Neuroscience*, 1991, 44(3):607-612.
- [7] Shichino T, Murakawa M, Adachi T, et al. Effects of isoflurane on in vivo release of acetylcholine in the rat cerebral cortex and striatum [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1997, 41(10):1335-1340.
- [8] Culley DJ, Yukhananov RY, Xie Z, et al. Altered hippocampal gene expression 2 days after general anesthesia in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 549 (下转第 781 页 to page 781)