

· 实验研究 ·

麻醉期间低体温对新生大鼠学习记忆能力的影响

刘文博 杨剑 熊兴龙 高鸿 刘婉玲 王礼鑫

【摘要】目的 探讨麻醉期间低体温状态对新生大鼠学习记忆能力的影响及其可能的作用机制。**方法** 出生 7 d 的 SD 新生大鼠 40 只,按随机数字表法分为四组($n=10$):对照组(C 组)、麻醉保温组(A 组)、麻醉低温组(AH 组)、物理低温组(H 组)。C 组腹腔注射 0.1 ml 生理盐水并配备加热垫保持直肠温度在 38~39℃;A 组以 25 mg/kg 腹腔注射丙泊酚 0.1 ml,每 20 分钟追加初始剂量的 1/2,麻醉维持 2 h,同 C 组方法保持直肠温度在 38~39℃;AH 组麻醉方式和时间与 A 组相同,大鼠在麻醉过程中不保温,控制室温为 23℃,允许体温自然下降;H 组大鼠腹腔注射 0.1 ml 生理盐水,同样控制室温为 23℃,使体温自然下降。麻醉过程中持续吸氧,2 h 内每 20 分钟监测记录一次体温。清醒后即刻,每组随机取 5 只大鼠采用 Western blot 法检测海马磷酸化-细胞外信号调节激酶(p-ERK)、磷酸化-环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(p-CREB)相对表达量。每组剩余 5 只大鼠继续饲养至 30 日龄进行水迷宫实验检测其空间学习记忆能力和海马 p-ERK、p-CREB 相对表达量。**结果** 降温 60 min,AH、H 组大鼠的直肠温度分别下降至(25.38±0.22)℃、(25.54±0.20)℃,明显低于 C 组(38.36±0.24)℃和 A 组(37.40±0.29)℃($P<0.05$)。清醒后即刻,AH、H 组 p-ERK 和 p-CREB 蛋白相对表达量明显低于 C 组和 A 组($P<0.05$)。30 d 四组大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数和原平台象限逗留时间差异无统计学意义。水迷宫测试结束时,四组大鼠 p-ERK 和 p-CREB 蛋白相对表达量差异无统计学意义。**结论** 麻醉期间体温降至 25℃ 时可短期抑制新生大鼠海马 p-ERK、p-CREB 表达,而对其远期学习记忆能力无明显影响。

【关键词】 低体温;细胞外信号调节激酶;环磷酸腺苷应答元件结合蛋白;新生大鼠;海马

Effects of hypothermia on learning and memory ability of neonatal rats during anesthesia LIU Wenbo, YANG Jian, XIONG Xinglong, GAO Hong, LIU Wanling, WANG Lixin. Department of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Corresponding author: YANG Jian, Email: 18786085605@139.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of hypothermia on the learning and memory ability of neonatal rats during anesthesia and its possible mechanism. **Methods** Forty SD rats aged 7 d were randomly divided into 4 groups ($n=10$): control group (group C), anesthesia group (group A), anesthesia and hypothermia group (group AH), hypothermia group (group H). Group C was injected intraperitoneally with 0.1 ml of saline and equipped with heating pad to keep the rectal temperature at 38-39℃. Group A was injected with propofol 0.1 ml at 25 mg/kg intraperitoneally with 1/2 of the initial dose, and anesthesia was maintained for 2 h. The same method to maintain the rectal temperature at 38-39℃; Group AH of anesthesia and time and Group A of the same, rats in the anesthesia process is not insulation, control room temperature of 23℃, allowing the body temperature decreased; Group H rats intraperitoneal injection of 0.1 ml saline, the same control room temperature of 23℃, so that the natural temperature drop. Anesthesia in the process of continuous oxygen, intermittent monitoring of body temperature. Immediately after awake, 5 rats in each group were randomly selected to detect the content of p-ERK and p-CREB in hippocampus by Western blot. The spatial learning and memory ability and p-ERK and p-CREB contents in hippocampus were measured by water maze test. **Results** The rectal temperature in group AH and group H decreased to (25.38±0.22)℃ and (25.54±0.20)℃ in 1 h respectively, and the body temperature decreased significantly compared with group C (38.36±0.24)℃ and group A (37.40±0.29)℃ ($P<0.05$). Compared with group C and group A, the expression of group AH and group H was decreased ($P<0.05$). At the end of the water maze test, the expression of protein in the four groups was not statistically signifi-

DOI: 10.12089/jca.2018.03.018

基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合 LH 字[2017]7202 号)

作者单位:550004 贵阳市,贵州医科大学麻醉学院(刘文博、杨剑、熊兴龙、高鸿、刘婉玲),病理教研室(王礼鑫)

通信作者:杨剑,Email:18786085605@139.com

cant. There was no significant difference between the four groups in the escape latency, the number of crossing the platform and the quadrant of the original platform quadrant. **Conclusion** The expression of p-ERK and p-CREB in neonatal rats hippocampus can be short-term inhibition in the period of hypothermia at 25°C, but no significant effect on the long-term learning and memory ability.

【Key words】 Hypothermia; Extracellular signal regulated kinase; Cyclic AMP response element binding protein; Neonatal rats; Hippocampus

长时间的冷暴露可以引起大鼠学习记忆损伤^[1],并可能导致海马区域的功能损害^[2]。目前国内有关低体温的研究集中于探讨缺血-再灌注损伤及其他颅脑损伤的保护作用与机制;而麻醉期间低体温是否对发育高峰期脑神经有损害作用,是否造成新生大鼠远期学习记忆能力下降尚未可知。本研究观察麻醉期间低体温状态对新生大鼠远期学习记忆能力的影响,并探讨可能的作用机制。

材料与方 法

实验动物与分组 出生 7 d 的 SD 新生大鼠 40 只,由贵州医科大学动物实验中心提供,体重 12~16 g,雌雄不限,按随机数字表法分为四组:对照组(C组)、麻醉保温组(A组)、麻醉低温组(AH组)、物理低温组(H组),每组 10 只。

实验方法 C组腹腔注射 0.1 ml 生理盐水并配备加热垫保持直肠温度在 38~39°C;A组以 25 mg/kg 腹腔注射丙泊酚(批号:16KK5643)0.1 ml,每 20 分钟追加初始剂量的 1/2,麻醉 2 h,同 C组方法保持直肠温度在 38~39°C;AH组麻醉方式及时间与 A组相同,大鼠在麻醉过程中不保温,控制室温条件为 23°C,允许体温自然地下降;H组大鼠腹腔注射 0.1 ml 生理盐水,同样控制室温为 23°C,使体温自然下降。麻醉过程中持续吸氧,观察大鼠呼吸、皮肤颜色,大鼠腹部固定带状婴儿脉搏血氧饱和度探头,并维持 SpO₂ 在 95%~99%,从麻醉开始即刻至麻醉结束时,每 20 分钟记录 1 次,防止大鼠脑缺氧。间断监测大鼠体温变化,注药后每 20 分钟记录 1 次。

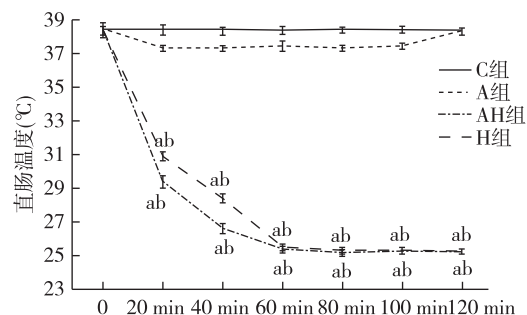
行为学测试 每组随机选取 5 只大鼠饲养至 30 d,采用 Morris 水迷宫检测实验动物的空间学习记忆能力,历时 5 d。行定位航行实验时,令实验动物在水迷宫内自由游泳 2 min 寻找水下平台(1.5 cm),并记录找到平台所需时间(逃避潜伏期),若 120 s 内未找到平台记录为 120 s,实验连续进行 4 d,每天训练 4 次。第 5 天行空间探索实验,拆掉水下平台,同样令动物自由游泳 2 min,记录 2 min 内穿越平台次数及原平台象限逗留时间。测试过程中保持实验室内灯光、物品等空间参照物摆放位置不变,水温保持在(25.0±1.0)°C,以排除干扰因素。

p-ERK 和 p-CREB 蛋白相对表达量测定 分别于大鼠麻醉清醒后即刻和 Morris 水迷宫测试结束时,每组随机选取 5 只大鼠处死,于冰上断头取大脑海马组织。海马组织称重后按每 20 mg 组织加入 150 μl 裂解液进行匀浆,匀浆后冰上静置裂解 1 h,待组织充分裂解后以 12 000 r/min 离心 10~15 min,上清液即为蛋白原液,采用 BCA 法进行蛋白定量。取 50 μg 蛋白在 10% SDS-PAGE 胶上电泳,后转移至硝酸纤维素滤膜,封闭液封闭 2 h,加入兔抗鼠 p-ERK 抗体(1:700)或兔抗鼠 p-CREB 抗体(1:300),4°C 孵育 12 h;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:10 000),室温孵育 1 h,运用 Tanon 5200 Multi 多功能成像系统曝光成像。应用 ImageJ 软件进行分析,以磷酸化-细胞外信号调节激酶(p-ERK)和磷酸化-环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(p-CREB)条带灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值反映 p-ERK 蛋白和 p-CREB 蛋白相对表达量。

统计分析 采用 SPSS 20.0 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,组间比较采用双因素方差分析,组内不同时间点比较采用重复测量设计的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

降温 60 min, AH 组和 H 组大鼠的直肠温度明显低于 C 组和 A 组($P < 0.05$)(图 1)。



注:与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 A 组比较, ^b $P < 0.05$

图 1 四组大鼠直肠温度变化的比较

水迷宫训练阶段,四组大鼠组间逃避潜伏期差异无统计学意义(图 2)。

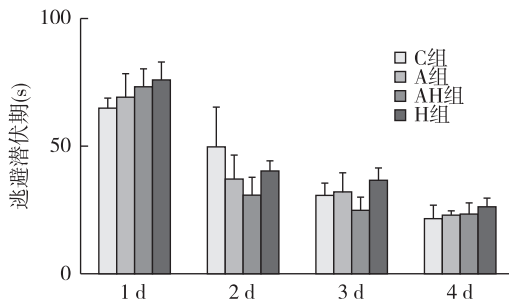


图2 四组大鼠不同时间点逃避潜伏期的比较

在空间探索试验中,四组大鼠 2 min 内穿越平台次数和原平台象限逗留时间差异无统计学意义(图 3,4)。

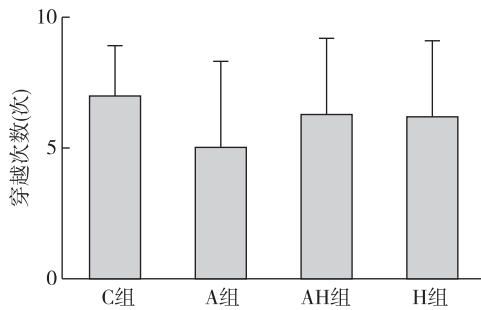


图3 四组大鼠穿越平台次数的比较

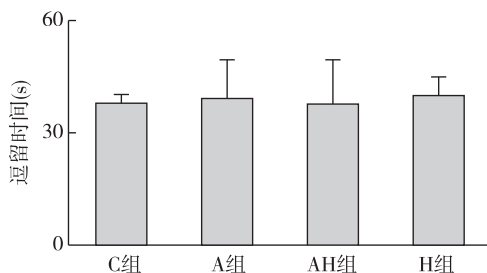


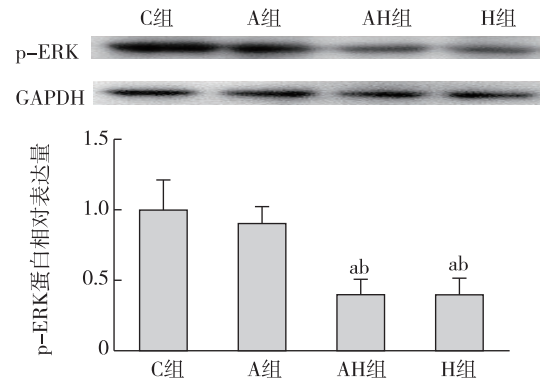
图4 四组大鼠原平台象限逗留时间的比较

清醒后即刻,AH、H组 p-ERK 和 p-CREB 蛋白相对表达量均明显低于 C 组和 A 组 ($P < 0.05$) (图 5,6)。

水迷宫结束时,四组大鼠 p-ERK 和 p-CREB 蛋白相对表达量差异无统计学意义(图 7,8)。

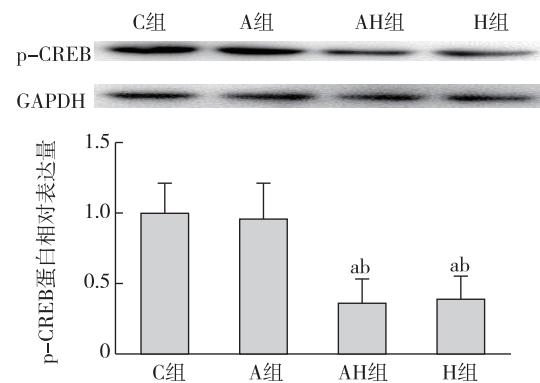
讨论

ERK 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的重要成员,该家族的信号转导通路对调节神经细胞的生长、增殖、分化和存活起重要作用。ERK 作为重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其在学习和记忆中具有非常重要的作用^[3,4]。进一步的研究显示,ERK 信号转导通路的激活参与了短时记忆向长时记忆的转化,也就是记忆的巩固过程^[5]。环磷腺苷



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 A 组比较,^b $P < 0.05$

图5 清醒后即刻四组大鼠海马 p-ERK 蛋白相对表达量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 A 组比较,^b $P < 0.05$

图6 清醒后即刻四组大鼠海马 p-CREB 蛋白相对表达量的比较

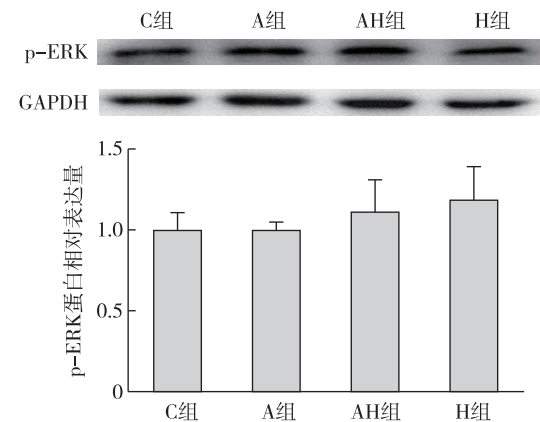


图7 水迷宫结束时四组大鼠海马 p-ERK 蛋白相对表达量的比较

效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)是一种调节基因转录的蛋白,在记忆形成过程中发挥重要作用^[6]。研究显示,其磷酸化蛋白与神经元发育及长时程增强作用

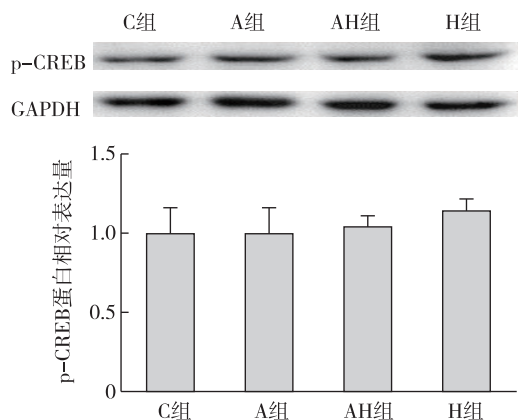


图 8 水迷宫结束时四组大鼠海马 p-CREB 蛋白相对表达量的比较

(LTP)关系密切^[7]。而作为 CREB 的上游信号分子,ERK 可直接磷酸化转录因子 CREB^[8]。

依据已有文献^[9]并结合本研究预实验结果,当丙泊酚的麻醉剂量为 25 mg/kg 时,即可使新生大鼠翻正反射消失,达到麻醉效果,因此选择该剂量进行麻醉,持续 2 h。而大鼠属于晚成性哺乳动物,刚出生的幼体只有微弱的体温调节能力,幼体被单独隔离后体温将随环境温度的下降而降低,并达到接近环境温度的水平^[10],因此结合预实验并参照 Whittington 等^[11]的研究方法,调控实验室环境温度为 23℃,在不保温的条件下,使新生大鼠体温随环境温度而下降,最低降至 25℃左右。根据文献,30 日龄的 SD 大鼠神经系统发育程度相当于 6~7 岁学龄期儿童^[12],因此本研究将干预过的新生大鼠喂养至 30 日龄,进行 Morris 水迷宫测试,以检测麻醉期间低体温对其远期学习记忆能力的影响。

国外有文献报道低体温可抑制大鼠海马组织中 ERK 的表达^[11],本研究清醒后即刻的结果与其一致。在寒冷应激状态下 Akt(蛋白激酶 B)-ERK 信号通路表达下调,大鼠海马 ATP 含量下降^[13]。而 ATP 对 ERK 的激活关系密切,因此 p-ERK 蛋白相对表达量的下调可能也与在低体温状态下,ATP 的含量下降有关。CREB 作为 ERK 的下游蛋白,当 ERK 表达受抑制时,其激活同样受到抑制。且 CREB 受多种通路调节,ATP 通过调控 cAMP/PKA 通路影响 CREB 的表达;另有研究显示 Akt/CREB 通路也是 CREB 磷酸化的主要途径之一^[14],而在低温状态下前两者活性的降低可能同样造成 p-CREB 下调。本研究结果显示,低体温可能是造成蛋白含量下调的主要原因。但短时间低体温对

机体的影响会在体温恢复后逐渐消失,其对神经系统的损害是可逆的。国外也有类似文献报道^[15]。

综上所述,麻醉期间体温降至 25℃时可短期抑制新生大鼠海马 p-ERK、p-CREB 表达,而对其远期学习记忆能力无明显影响。

参 考 文 献

- [1] McEwen BS. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, 2000, 22(2): 108-124.
- [2] McEwen B, Lupien S. Stress; hormonal and neural aspects. *Encyclopedia of the Human Brain*, 2002, 37(3):463-474.
- [3] 康湘萍, 金国琴. 学习记忆相关信号转导蛋白. *生命的化学*, 2012, 32(2):117-122.
- [4] Peng S, Zhang Y, Zhang J, et al. ERK in learning and memory: a review of recent research. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(1): 222-232.
- [5] 张英, 郑利民, 吴新民. 丙泊酚对大鼠海马 ERK1、ERK2 磷酸化和 ERK2 mRNA 表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2010, 26(7):607-609.
- [6] Huang CH, Chiang YW, Liang KC, et al. Extra-cellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activated in the hippocampal CA1 neurons is critical for retrieval of auditory trace fear memory. *Brain Res*, 2010, 1326:143-151.
- [7] 杨剑, 于子龙, 高鸿, 等. 不同剂量瑞芬太尼对发育期大鼠短期学习记忆能力的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(9): 910-913.
- [8] 刘海林, 钱燕宁. 脊髓 ERK-CREB 信号通路在吗啡依赖大鼠戒断反应中的作用. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(3): 307-310.
- [9] 王玉洁, 韩彬, 郭向阳, 等. 不同剂量异丙酚在新生大鼠不同脑区的分布. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6):602-606.
- [10] 迟庆生, 王德华. 晚成性哺乳动物体温调节能力的胎后发育. *动物学杂志*, 2005, 40(6): 137-143.
- [11] Whittington RA, Bretteville A, Virág L, et al. Anesthesia-induced hypothermia mediates decreased ARC gene and protein expression through ERK/MAPK inactivation. *Sci Rep*, 2013, 3: 1388.
- [12] 李兵达, 罗佛全, 赵为禄, 等. 孕早期氯胺酮麻醉对子代大鼠海马 hippyragranin mRNA 表达的影响. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(11):1334-1336.
- [13] 马金龙, 郑刚, 沈学锋, 等. 寒冷对大鼠学习记忆影响及其机制的研究. *现代生物医学进展*, 2009, 9(24):4615-4617.
- [14] Hazra S, Kumar S, Saha GK, et al. Reversion of BDNF, Akt and CREB in hippocampus of chronic unpredictable stress induced rats: effects of phytochemical, bacopa monnieri. *Psychiatry Investigation*, 2017, 14(1):74-80.
- [15] Tan W, Cao X, Wang J, et al. Tau hyperphosphorylation is associated with memory impairment after exposure to 1.5% isoflurane without temperature maintenance in rats. *Eur J Anaesthesiol*, 2010, 27(9): 835-841.

(收稿日期:2017-07-07)