

[论著]

丙泊酚对成年大鼠的认知功能及海马 CA1 区糖原合成酶激酶 - 3 β (GSK - 3 β) 的影响*

刘 艳 崔彩莲 吴臻桢**

(北京大学神经科学研究所、北京大学基础医学院神经生物学系、
神经科学教育部和卫生部重点实验室,北京,100191)

摘要 目的: 观察丙泊酚麻醉对成年大鼠空间认知功能及海马 CA1 区 GSK - 3 β 水平的影响。方法: 成年 SD 大鼠经尾静脉注射丙泊酚麻醉 6 h, 苏醒后 24 h 接受莫里斯水迷宫(Morris Water Maze, MWM) 训练, 观察全身麻醉对大鼠认知功能的影响; 采用免疫荧光和 Western blot 技术, 检测大鼠海马 CA1 区 GSK - 3 β 水平的变化。结果: 与对照组相比, 丙泊酚麻醉组大鼠在 MWM 任务的隐藏平台($P < 0.01$)、反向平台($P < 0.01$) 和空间探索实验($P < 0.05$) 的空间学习和记忆能力显著下降; 同时伴有 CA1 区磷酸化的 GSK - 3 β (p - GSK - 3 β) 表达水平的下降($P < 0.05$), GSK - 3 β 水平不变($P > 0.05$)。结论: 丙泊酚麻醉可引起成年大鼠空间学习和记忆功能损害, 其机制可能与降低海马 CA1 区的 GSK - 3 β 的磷酸化水平有关。

关键词 丙泊酚; 全身麻醉; 术后认知功能损害; GSK - 3 β

doi: 10.13936/j.cnki.cjdd1992.2015.06.006

中图分类号 R614

EFFECTS OF PROPOFOL ANESTHESIA ON COGNITIVE FUNCTION AND LEVEL OF GLYCOGEN SYNTHASE KINASE - 3BETA IN HIPPOCAMPUS CA1 IN ADULT RATS

LIU Yan, CUI Cailian, WU Liuzhen

(Neuroscience Research Institute, Peking University, Department of Neurobiology,
School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center;

Key Laboratory of Neuroscience, The Ministry of Education and Ministry of Public Health, Beijing, 100191)

ABSTRACT *Objective:* To investigate whether propofol impairs the spatial learning and memory abilities and alters the level of GSK - 3 β (glycogen synthase kinase - 3beta, GSK - 3 β) in the CA1 of hippocampus in adult rats. *Methods:* Rats received propofol anesthesia via intravenous injection for 6 h. Morris Water Maze training was conducted 24 h after the end of anesthesia to observe the effect of propofol anesthesia on learning and memory function in SD adult rats, and the level of GSK - 3 β in the CA1 in rats was detected by Western blot and immunofluorescence. *Results:* Propofol anesthesia impaired learning and memory associated with hidden platform and reversal platform training, as well as probe test in adult rats. Moreover, the level of p - GSK - 3 β in the CA1 of rats decreased significantly after propofol treatment. *Conclusion:* Propofol anesthesia induces spatial learning and memory impairment in adult rats, which may be associated with the decrease of p - GSK - 3 β in the CA1.

KEY WORDS propofol; general anesthesia; postoperative cognitive dysfunction; GSK - 3 β

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive

dysfunction, POCD) 是一组以患者在麻醉和手术后发生的以认知功能减退为特征的临床综合征^[1]。POCD 可影响术后恢复, 增加术后死亡率, 并降低患者生活质量。随着全球范围的手术量的增加, POCD

* 国家自然科学基金委创新研究群体基金(81221002); 国家重大科学研究计划(973 计划) 项目(2013CB531905)

** 通讯作者: E-mail: liuzw@bjmu.edu.cn

已成为备受重视的健康问题。

已有研究显示,全身麻醉在 POCD 的发生中起着重要作用。丙泊酚是目前临床上最为常用的麻醉药物之一,用于各类手术的诱导和维持麻醉,亦广泛用于 ICU 病房患者的镇静。丙泊酚和其它麻醉剂(如异氟醚)类似,也可以引起婴幼儿和老年个体的术后认知功能障碍^[2]。尽管成年患者占了临床手术患者的很大一部分,但是目前有关丙泊酚对成年患者的认知功能影响的研究报道很少。

麻醉诱发的海马神经细胞损伤被认为是引起 POCD 的一个重要原因^[3]。GSK-3 β 是多种胞内信号通路的中心元件,不仅广泛表达于全身各组织,而且在中枢神经系统的表达水平最高^[4]。GSK-3 β 的活性是通过特异性位点的磷酸化来调节的。GSK-3 β 的活化状态需要酪氨酸 216 位点的磷酸化,而丝氨酸 9(Ser 9) 位点的磷酸化则会抑制 GSK-3 β 的活性。其中 Ser 9 位点的磷酸化水平是 GSK-3 β 活性调节的主要途径^[5]。研究显示,GSK-3 β 不仅具有直接促进细胞凋亡的作用,也可以被促细胞生存通路(PI-3K / Akt 信号通路)抑制而维持细胞的存活^[6]。因此,我们推测 GSK-3 β 活性的增加可能参与 POCD 中的海马神经元损伤。

因此,本实验采用 MWM 模型检测丙泊酚全身麻醉对成年大鼠的空间学习和记忆功能的影响,并探讨 GSK-3 β 在 POCD 过程中的改变,以期为丙泊酚麻醉副作用提供实验依据,深化对 POCD 的神经生物学机制的理解。

1 材料与方法

1.1 动物

本实验采用 Sprague Dawley δ 大鼠,起始体重 230 g-260 g,清洁级,购买并饲养于北京大学医学部动物部(实验动物生产许可证号:SCXK(京)2011-0012,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2011-0039)。饲养室温度控制在 22 \pm 1 $^{\circ}$ C,湿度 50% \pm 5%,12 h 光/暗交替,每天早晨 7 点开始照明。除特殊说明外,动物均可自由饮水、摄食。

1.2 主要实验试剂

丙泊酚购自四川国瑞药业有限责任公司;GSK-3 β 和 p-GSK-3 β (Ser 9) 抗体购自 CST 公司;Anti- β -Actin 购自 Sigma 公司。二抗(HRP 标记的山羊抗小鼠抗体、HRP 标记的山羊抗兔抗体)购自北京中杉金桥生物科技有限公司。胞核-胞浆-胞膜制备试剂盒与 Super ECL 超敏发光液购自北京

普利莱科技有限公司。

1.3 主要实验仪器

Morris 水迷宫装置(DMS-1),中国医学科学院药物研究所制造;冰冻切片机(Lecia 1900),德国 LEICA 公司制造;倒置荧光显微镜(BH-2),日本 OLYMPUS 公司制造。

1.4 实验方法

1.4.1 全身麻醉 大鼠在 25 $^{\circ}$ C 室内安静环境下接受麻醉,麻醉前将大鼠固定于专用动物套筒中,暴露尾部。用温水浸泡大鼠尾部后 1/3 部,待静脉显露后用酒精棉消毒待穿刺部位,用静脉穿刺针以 15 $^{\circ}$ 角斜穿入大鼠尾静脉,回抽有静脉血后固定针头,推入 0.25 ml 丙泊酚诱导麻醉。将大鼠从套筒取出并置于电热垫上,以 0.1 ml \cdot 6 min⁻¹ 的速度推入丙泊酚维持麻醉 6 h,期间根据大鼠对麻醉药物的反应调整给药速度。维持麻醉期间严密观察大鼠皮肤黏膜颜色、呼吸情况。

1.4.2 水迷宫训练 水迷宫装置包括计算机、监视器、摄像头和水槽。本装置采用内壁为黑色的圆形水槽,直径 150 cm,摄像头位于水槽正上方约 150 cm 处。实验时在水槽中注入清水,水温控制在 22 \pm 1 $^{\circ}$ C,水槽周围用白色布帘围住,通过监视器观察大鼠在水中的游动情况。计算机内专用软件可同步记录动物找到平台的时间、在各个象限停留时间、运动轨迹等。(水迷宫训练流程如图 1 所示)。

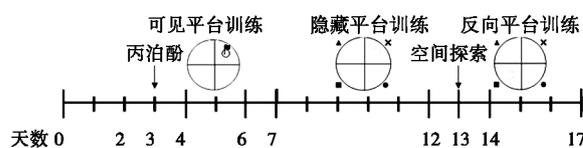


图 1 水迷宫训练流程

1.4.2.1 适应期 将透明平台置于水池中心,略高于水面。每日将大鼠置于平台上 1 min,重复 3 次,为期 2 d。适应期的训练目的是令大鼠建立水槽内有平台的概念。

1.4.2.2 可视平台训练 将平台置于水槽的某一象限,略高于水平面,在平台上放置一面红旗。将水槽外围用无标志的白色布帘围住,从平台所在象限以外的三个象限随机将大鼠面朝水槽壁轻轻放入水中,同时启动水迷宫记录程序,以大鼠两前肢接触平台为标准终止程序。终止程序后,让大鼠在平台上继续停留 20 s。如大鼠 60 s 内未能到达平台,实验者需将其引导到平台并让大鼠在平台上停留 20 s。

每次训练结束后操作者需清除水槽中大鼠排泄物,并搅动水面以消除上一次训练遗留的嗅觉痕迹。可视平台训练的目的在于检测大鼠的动机、感觉功能和视觉功能是否正常。

1.4.2.3 隐藏平台训练 将平台置于水槽的某一象限,低于水平面 1-2 cm,在水槽各象限对应的外围白色布帘上贴上黑色标志物(各象限分别为横条、竖条、正方形和三角形),此训练期大鼠需依据标志物的形状分辨和记忆水下平台的位置。从平台所在象限以外的三个象限随机将大鼠面朝水槽壁轻轻放入水中进行训练。记录大鼠寻找隐藏平台过程中的相关数据

1.4.2.4 空间探索实验 撤去平台,将大鼠面向池壁放入水中 60 秒,记录大鼠在各个象限内的停留时间和在原平台所在区域的穿梭次数。

1.4.2.5 反向平台训练 将平台移至原象限的对侧象限,依然低于水平面 1 cm-2 cm。从平台所在象限以外的三个象限随机将大鼠面朝水槽壁轻轻放入水中,记录大鼠寻找新平台过程中的相关数据。

1.5 免疫荧光法

腹腔注射水合氯醛(300 mg·kg⁻¹)将大鼠麻醉,采用自制灌注装置从大鼠左心室插管依次注入 200 ml 生理盐水和 250 ml 预冷(4℃)的 4% PFA 溶液灌注固定,取脑,经蔗糖梯度脱水后包埋。在冰冻切片机上连续切片至海马 CA1 区,每片厚度 20 μm,每隔 5 片取 1 张,每个标本取 3 张,每组共 18 张切片。PBS 漂洗脑片 3 次,用羊血清(含 0.3% TritonX-100)室温下封闭 1 h,加一抗(1:400)后置入湿盒内 4℃ 过夜,d2 用 PBS 漂洗 3 次,加二抗(1:200)室温下避光孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次后封片,在倒置荧光显微镜下阅片。

1.6 蛋白印迹法

在核团中加入 200 μl 的细胞溶质提取剂(CER),超声匀浆后 12 000 g 4℃ 离心 10 min,取上清即为总蛋白提取液,采用 BCA 试剂盒检测蛋白含量,加 2 × loading buffer 缓冲液。依次进行制胶(12% 分离胶和 5% 浓缩胶)、上样(50 μg)、电泳、湿法转膜和封闭。封闭结束后一抗(1:1000)4℃ 孵育过夜;次日,将 PVDF 膜置于 TBST 中洗 3 次,二抗 IgG(1:2000)室温孵育 PVDF 膜 1 h,随后将 PVDF 膜置于 TBST 中洗 3 次。Super ECL 超敏发光液敷于膜上 3 min 后前往暗室曝光成像。用凝胶成像分析系统对曝光后的 X 光片进行扫描,读取光密度值。以 β-actin 为内参,对目标蛋白的光密度值进

行校正,每批样本重复 3 次。

1.7 统计学方法

将数据输入 Microsoft Excel 加以计算、整理、保存。统计学分析软件采用 Prism 5.0 版。两组数据间差异用双尾 student *t*-test 分析或重复测量双因素方差分析,以 *P* < 0.05 作为有统计学差异的界限。

2 结果

2.1 丙泊酚麻醉对大鼠水迷宫可见平台训练和游泳速度的影响

大鼠经尾静脉注射丙泊酚维持麻醉 6 h 后,为了检测大鼠的非空间学习和记忆功能以及运动能力,我们于麻醉苏醒 24 h 后进行为期两天的可见平台训练。统计各组逃跑潜伏期和游泳速度,结果显示,对照组和丙泊酚组大鼠均可在可见平台训练的 d2 找到平台位置,两组大鼠的逃跑潜伏期和游泳速度均无显著性差异(*P* > 0.05)。提示丙泊酚麻醉并不影响大鼠的逃生动机、感觉功能和运动功能(见表 1)。

表 1 大鼠可见平台期的逃跑潜伏期与游泳速度($\bar{x} \pm s$)

组别	d1 逃跑潜伏期 (s)	d2 逃跑潜伏期 (s)	平均游泳速度 (cm·s ⁻¹)
对照组	37.46 ± 16.78	16.26 ± 10.09	17.87 ± 5.76
丙泊酚组	39.35 ± 12.17	17.22 ± 16.04	18.23 ± 9.08

各组数值用 Means ± SD 表示, *n* = 12, *t* 检验, * *P* < 0.05

2.2 丙泊酚对大鼠水迷宫隐藏平台训练、空间探索实验和反向平台训练的影响

为观察丙泊酚对大鼠的空间学习和记忆功能的影响,紧随可见平台训练之后依次进行了隐藏平台训练、空间探索实验和反向平台训练。结果显示,丙泊酚大鼠在隐藏平台训练期间的逃跑潜伏期显著长于对照组(*P* < 0.01)(见图 2 A);在空间探索实验中,丙泊酚组大鼠在原平台所在位置穿梭次数和原平台所在象限(第二象限)探索时间均显著少于对照组(*P* < 0.05)(见图 2 C 和 2 D);在反向平台训练期逃跑潜伏期显著长于对照组(*P* < 0.01)(见图 2 B)。上述结果提示丙泊酚麻醉可以损害大鼠的空间学习和记忆功能。

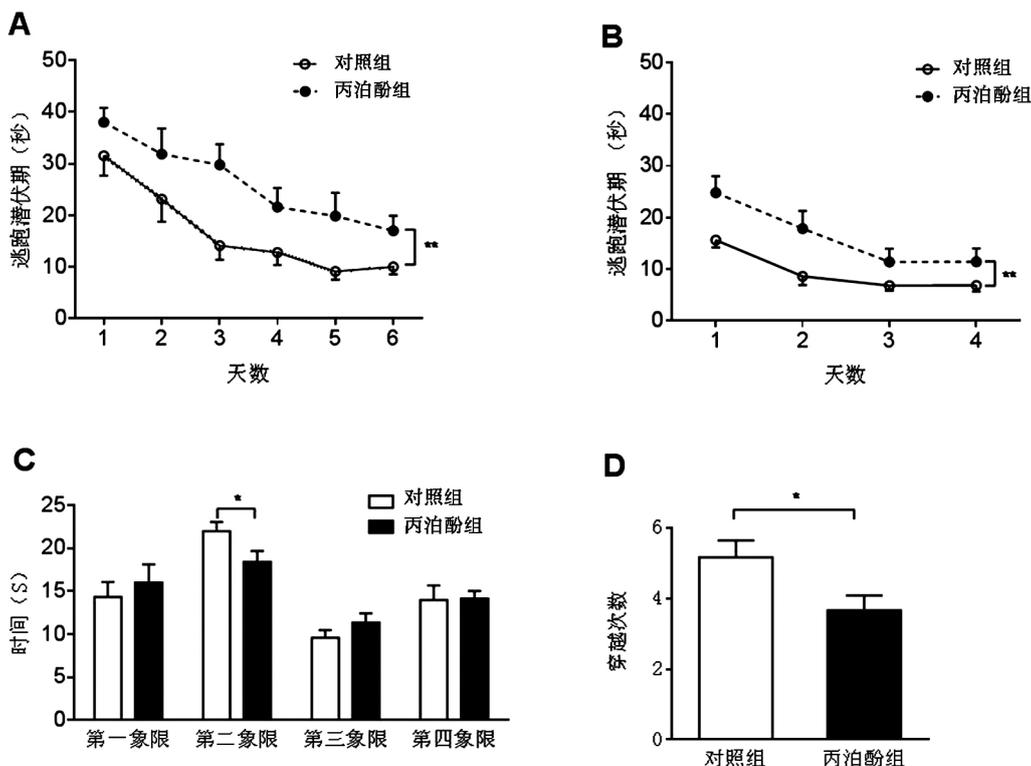


图2 隐藏平台、反向平台和空间探索实验结果

(1) A 图为隐藏平台训练结果,丙泊酚组逃跑潜伏期显著长于对照组(结果以 Means ± SEM 表示, n = 12,采用重复测量双因素方差分析, ** P < 0.01)。(2) B 图为反向平台训练结果,丙泊酚组逃跑潜伏期显著长于对照组(结果以 Means ± SEM 表示, n = 12,采用重复测量双因素方差分析, ** P < 0.01)。(3) C、D 图为空间探索实验结果,丙泊酚组在目标象限(第二象限)探索的时间显著少于对照组(见图 C),且在原平台所在位置穿梭的次数亦显著少于对照组(见图 D)(结果以 Means ± SEM 表示, n = 12, t 检验, * P < 0.05)。

2.3 丙泊酚麻醉 6 h 可引起大鼠海马 CA1 区 p - GSK - 3β(Ser 9) 的下调

水迷宫训练结束后,用免疫荧光染色法分析大鼠海马 CA1 区 p - GSK - 3β(Ser 9) 水平的变化。结果显示,丙泊酚组 CA1 区的 p - GSK - 3β(Ser 9) 荧光强度显著弱于对照组(见图 3 A)。用 Western Blot 法分析各组大鼠 CA1 区 p - GSK - 3β(Ser 9) 和 GSK - 3β 的蛋白含量,结果显示,与对照组相比,丙泊酚组 p - GSK - 3β(Ser 9) 的表达水平显著下降 (P < 0.01) (见图 3 B);丙泊酚组总 GSK - 3β 水平

无明显变化(P > 0.05) (见图 3 C)。

3 讨论

目前的研究认为,麻醉导致的 POCD 具有明显的年龄相关性^[1]。在个体的新生期暴露于全身麻醉,可引起神经元凋亡、突触可塑性、神经发生等方面发生变化,并可导致成年后的认知损害和行为异常^[7-8];全身麻醉在老年个体则可通过 Tau 蛋白激酶和 Aβ 途径加剧神经退行性变,从而引起认知功能减退^[3-9]。与婴幼儿和老年个体相比,成年个体在接受丙泊酚全身麻醉后不易出现认知功能障碍^[10-11]。然而这些结论均是建立在麻醉时间为 2 h 的动物模型的基础上;当丙泊酚用于大型手术的维持麻醉或病房患者的镇静时,使用时间通常远大于 2 h,长者可达数周。因此,研究丙泊酚长时间使用的安全性是非常必要的。本实验发现,丙泊酚麻醉 6 h 可引起成年大鼠空间学习和记忆功能损害。因此,在临床实践中即使是针对青壮年患者,仍需考虑到丙泊酚对认知功能的损害作用,尤其对需要长期使用丙泊酚镇静的患者,应进行合理用药的评估。

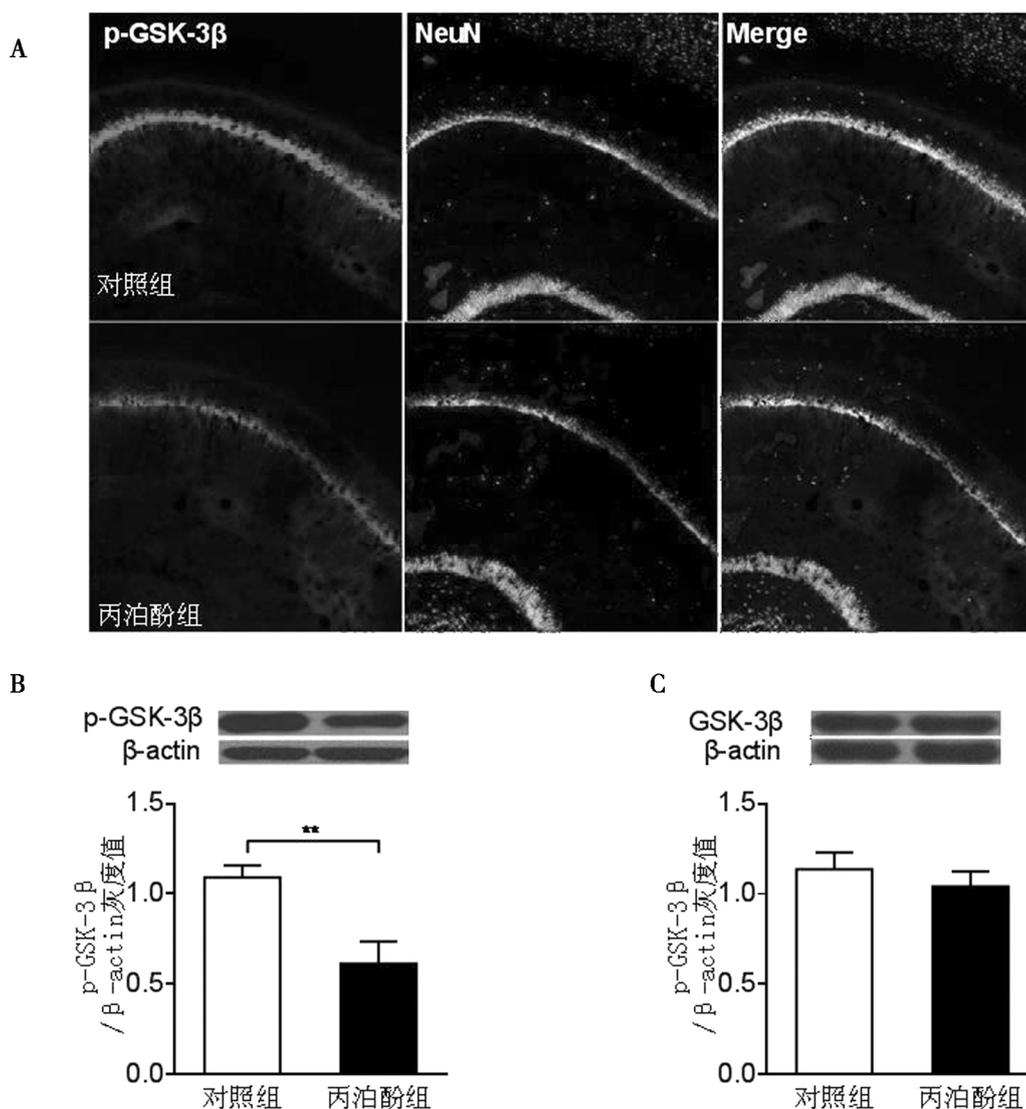


图3 丙泊酚全身麻醉对海马CA1脑区GSK-3β水平的影响

(1) A图为海马CA1区p-GSK-3β(Ser 9)免疫荧光染色图(100x),与对照组相比,丙泊酚组荧光强度减弱。(2) B图为海马CA1区p-GSK-3β(Ser 9)蛋白半定量示意图与统计图,与对照组相比,丙泊酚组p-GSK-3β(Ser 9)水平显著下降(结果以Means ± SEM表示, n=6, t检验, * P < 0.01)。(3) C图为海马CA1区GSK-3β蛋白半定量示意图与统计图,两组GSK-3β水平无显著性差异(结果以Means ± SEM表示, n=6, t检验, P > 0.05)。

近年来研究发现GSK-3β可能为神经退行性疾病如阿尔兹海默病潜在的治疗靶点^[12]。在转基因小鼠的海马和皮层过表达GSK-3β可引起tau蛋白激酶PHF1表位的磷酸化,导致tau在突触部富集而引起神经退行性变^[13]。Noble等发现,持续性抑制GSK-3的活性可以显著降低转基因小鼠tau蛋白在突触区的堆积^[14]。Hsing等发现,腹腔注射丙泊酚可引起小鼠发生GSK-3β调控的巨噬细胞

凋亡^[15]。我们的免疫荧光和蛋白印迹实验结果发现,与对照组相比,丙泊酚处理组大鼠海马CA1区p-GSK-3β(Ser 9)水平显著下降(总的GSK-3β水平无明显变化),也即丙泊酚组CA1区的GSK-3β的活性总体上是升高的。我们推测这一改变可能与丙泊酚引起成年大鼠学习和记忆功能损害有关,提示GSK-3β可能是POCD发生的主要分子机制之一。

4 参考文献

[1] Bonke B. Postoperative cognitive dysfunction in the elderly[J]. Lancet, 1998, 351(9119): 1889

- [2] Xie Z. Neuronal vulnerability to anesthesia neurotoxicity depends on age of neurons [J]. *Ann Neurol*, 2013, 73(6): 686-687
- [3] Wang H, Xu Z, Feng C, et al. Changes of learning and memory in aged rats after isoflurane inhalational anaesthesia correlated with hippocampal acetylcholine level [J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2012, 31(3): e61-e66
- [4] Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A [J]. *EMBO J*, 1990, 9(8): 2431-2438
- [5] Doble BW. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(7): 1175-1186
- [6] Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65(4): 391-426
- [7] Tu S, Wang X, Yang F, et al. Propofol induces neuronal apoptosis in infant rat brain under hypoxic conditions [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 86(1-2): 29-35
- [8] Yu D, Jiang Y, Gao J, et al. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 41-46
- [9] Briner A, Nikonenko I, De Roo M, et al. Developmental stage-dependent persistent impact of propofol anesthesia on dendritic spines in the rat medial prefrontal cortex [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(2): 282-293
- [10] Lee IH, Culley DJ, Baxter MG, et al. Spatial memory is intact in aged rats after propofol anesthesia [J]. *Anesth Analg*, 2008, 107(4): 1211-1215
- [11] Crosby C, Culley DJ, Baxter MG, et al. Spatial memory performance 2 weeks after general anesthesia in adult rats [J]. *Anesth Analg*, 2005, 101(5): 1389-1392
- [12] Klafki HW, Staufenbiel M, Kornhuber J, et al. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2006, 129(11): 2840-2855
- [13] Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, et al. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice [J]. *EMBO J*, 2001, 20(1-2): 27-39
- [14] Noble W, Olm V, Takata K, et al. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo [J]. *Neuron*, 2003, 38(4): 555-565
- [15] Hsing CH, Chen YH, Chen CL, et al. Anesthetic propofol causes glycogen synthase kinase-3beta-regulated lysosomal/mitochondrial apoptosis in macrophages [J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(4): 868-881

收稿日期: 2015-04-01

修回日期: 2015-06-06

(上接第420页)

- [5] Li G, Yan W, Cai F, et al. Spatial learning and memory impairment and pathological change in rats induced by acute exposure to microcystin-LR [J]. *Environ Toxicol*, 2014, 29(3): 261-268
- [6] Edwards SR, Hamlin AS, Marks N, et al. Comparative studies using the Morris water maze to assess spatial memory deficits in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(10): 798-806
- [7] Saroja SR, Sase A, Kircher SG, et al. Hippocampal proteoglycans brevican and versican are linked to spatial memory of Sprague-Dawley rats in the morris water maze [J]. *J Neurochem*, 2014, 130(6): 797-804
- [8] Davidson C, Gow AJ, Lee TH, et al. Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 36(1): 1-22
- [9] Thrash B, Karuppagounder SS, Uthayathas S, et al. Neurotoxic effects of methamphetamine [J]. *Neurochem Res*, 2010, 35(1): 171-179
- [10] López-Arnau R, Martínez-Clemente J, Pubill D, et al. Serotonergic impairment and memory deficits in adolescent rats after binge exposure of methylone [J]. *J Psychopharmacol*, 2014, 28(11): 1053-1063
- [11] Kalivas PW, O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(1): 166-180

收稿日期: 2015-04-13

修回日期: 2015-05-20