

· 临床研究 ·

右美托咪啶与咪达唑仑对幼鼠神经细胞损伤及学习记忆功能的影响

柏平, 吴修建[△], 闫东

(重庆医科大学附属永川医院麻醉科, 重庆永川 402160)

摘要:目的 探讨右美托咪啶(Dex)与咪达唑仑多次镇静对幼年大鼠神经细胞损伤及成年后学习记忆功能的影响。方法 采用随机数字表法,将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组($n=12$):对照组(C组)、咪达唑仑组(M组)和 Dex 组(D组)。C组大鼠每日皮下注射生理盐水 0.1 mL/kg。M组大鼠每日皮下注射咪达唑仑 2.4 mg/kg(0.1 mL/kg)。D组大鼠每日皮下注射 Dex 75 μ g/kg(0.1 mL/kg)。各组大鼠每日注药 1 次,共进行 3 d。于用药结束后 6 h 取血浆测定 S100 β 蛋白,神经元特异性烯醇化酶(NSE)含量。于用药结束后 2 月,采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠成年后学习记忆能力。结果 与 C 组比较,M 组成年后水迷宫实验逃逸潜伏期延长,穿越原平台次数减少。用药结束后 6 h,血清 S100 β 蛋白,NSE 表达上升,差异有统计学意义($P<0.01$)。D 组各项指标变化无显著性。结论 相比于咪达唑仑,新型麻醉镇静药 Dex 对幼年动物神经细胞损伤及成年后学习记忆功能的影响较小。

关键词:学习;记忆;咪达唑仑;右美托咪啶;幼年

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.25.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)25-2966-03

Influence of multiple sedation of dexmedetomidine and midazolam on young rats' nervous injury and learning and memory ability after grow up

Bai Ping, Wu Xiujian[△], Yan Dong

(Department of Anesthesiology, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Yongchuan, Chongqing 402160, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of multiple sedation of dexmedetomidine(Dex) and midazolam on young rats' nervous injury and the learning and memory ability after grow up. **Methods** 36 male SD rats were randomly allocated to 3 groups ($n=12$): control group(C), midazolam group (M) and dexmedetomidine group(D). The group C was given normal saline 0.1 mL/kg by subcutaneous injection. The group M was subcutaneously injected by midazolam 2.4 mg/kg, 0.1 mL/kg. The group D was subcutaneously injected by dexmedetomidine 75 μ g/kg, 0.1 mL/kg. Each group received once injection for 3 d. Plasma S100 β , NSE were measured at 6 h after medication. The rats' memory ability after grow up was assessed by the Morris water maze test. **Results** Compared with the group C, the escape latency in the group M was extended and the times across the platform was decreased. The expressions of S100 β and NSE in the group M were enhanced at 6 h after medication. There was no statistical difference between the group C and D. The changes of various indexes in the group D had no significance. **Conclusion** Compared with midazolam, using new type narcotic and sedative agent dexmedetomidine had little influence on the young rat nervous injury and the learning and memory ability after grow up in rat.

Key words: learning; memory; midazolam; dexmedetomidine; young

随着麻醉镇静药物对脑功能影响研究的深入,麻醉镇静对小儿智力发育的影响再度引起人们的重视^[1]。动物实验证实幼年动物长时间使用麻醉镇静药物可损伤成年后学习记忆能力^[2-3]。临床回顾性研究显示:小儿手术麻醉与其智力发育迟滞、注意力不集中、记忆力相对弱化等关系密切,特别是多次手术麻醉影响更为明显^[4-5]。由于伦理等限制,临床前瞻性研究很难进行。但寻找对小儿智力发育相对更安全的麻醉镇静药物已提上日程。右美托咪啶(Dex)是新型麻醉镇静药物,研究发现其对发育期大脑可能具有保护作用^[6]。本实验对比观察多次使用 Dex 和咪达唑仑对幼年大鼠神经细胞损伤及成年后学习记忆功能的影响,现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 实验动物选择 SD 大鼠 36 只,18~21 d,雄性,由

成都达硕生物科技有限公司动物实验中心提供。大鼠饲养于饲养室,饲养室湿度 60%左右,温度 23~25 $^{\circ}$ C,光线良好,12 h 昼夜交替,大鼠随意进食,取水。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及模型制备 实验动物分为对照组(C组)、咪达唑仑组(M组)、Dex 组(D组),每组 12 只。C组大鼠每日皮下注射生理盐水 0.1 mL/kg。M组大鼠每日皮下注射咪达唑仑 2.4 mg/kg(0.1 mL/kg)。D组大鼠每日皮下注射 Dex 75 μ g/kg(0.1 mL/kg)。各组大鼠每日注药 1 次,共进行 3 d。

1.2.2 S100 β 蛋白、神经元特异性烯醇化酶(NSE)含量测定 各组大鼠于注药后 6 h 取尾静脉血浆,立即按照 S100 β 试剂盒、NSE 试剂盒说明书进行测定。

1.2.3 Morris 水迷宫行为训练和测试^[7] Morris 水迷宫仪

器为直径 120 cm,高 50 cm 的圆形水池,水色为不透明黑色,在水池边缘上等距离设东、西、南、北 4 个标记点,将水池均等分为 4 个象限。水池水深 30 cm,在第 3 象限正中距池壁 30 cm 放 1 个圆形透明站台,水面高出站台表面 1.5 cm。水温控制在(22.0±0.5)℃。各组动物实验前 1 d 分别放入水中 2 min 适应环境。实验在隔音的房间内进行,水池、光源、鼠笼、站台等实验室各物件的位置保持不变。

大鼠于麻醉后 2 月进行水迷宫实验。(1)定位航行实验(place navigation test,PNT):实验历时 6 d,前 3 d 作为训练,后 3 d 作为测试成绩。每只大鼠每天训练 4 次,每次从不同的象限采用随机的入水点,每次实验以 60 s 为限,实验时将大鼠面朝池壁轻轻放入水中,同时计算机自动记录大鼠从入水点到达站台所需时间(潜伏期)作为学习和记忆成绩。大鼠找到并爬上站台后,让其停留 30 s;若大鼠入水后 60 s 内未能找到或爬上站台,则将其放置于站台上站立 30 s(记录为 60 s)。然后将大鼠从站台上取下休息至少 30 min,再进行下一次训练。记录大鼠找到平台的时间,即逃逸潜伏期 4 次平均值作为当天数据记录。(2)空间探索实验(spatial probe test,SPT):训练完毕次日进行空间探索实验,撤除平台,记录大鼠 60 s 内穿过原平台位置的次数作为空间记忆成绩。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 S100β、NSE 含量测定 与 C 组相比,M 组大鼠多次使用咪达唑仑后血清 S100β 蛋白、NSE 明显上升。而 D 组多次使用 Dex 后 S100β、NSE 未出现明显变化,见表 1。

表 1 S100β、NSE 含量测定($\bar{x} \pm s$,ng/mL)

组别	n	S100β	NSE
C 组	12	0.29±0.04	2.02±0.22
M 组	12	0.81±0.02 ^a	5.11±0.49 ^a
D 组	12	0.31±0.03	2.11±0.19

^a: $P < 0.01$,与 C 组比较。

2.2 Morris 水迷宫测试结果

2.2.1 定位实验结果 M 组大鼠平均逃逸潜伏期相比 C 组于术后第 4、5、6 天明显上升。D 组与 C 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。同一天内,各组游泳速度差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、3。

表 2 逃逸潜伏期($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 4 天	第 5 天	第 6 天
C 组	12	15.08±1.82	13.98±1.35	9.72±1.20
M 组	12	24.11±2.33 ^a	18.69±1.22 ^a	11.60±1.25 ^a
D 组	12	16.15±1.67	13.90±1.42	9.08±1.13

^a: $P < 0.01$,与 C 组比较。

表 3 定位航行实验大鼠游泳速度($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 4 天	第 5 天	第 6 天
C 组	12	343.11±29.13	335.55±29.87	259.32±19.87
M 组	12	355.33±36.25	307.43±30.22	267.43±25.78
D 组	12	361.98±32.44	312.23±21.89	271.23±25.50

2.2.2 空间探索实验 M 组大鼠穿过原平台次数[(3.25±0.51)次]相比 C 组[(3.63±0.69)次]明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。D 组穿过原平台次数[(3.58±0.21)次]与 C 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。同一天内,各组游泳速度差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

麻醉镇静药物对神经功能的损害作用及对学习记忆能力的影响已有越来越多的报道。例如老年人手术麻醉后常出现术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction,POCD)^[8-9]。麻醉镇静药物对小儿的影响也再度引起人们重视。离体研究发现^[10-11],能导致发育期大脑细胞凋亡和退化的全身麻醉药物包括:咪达唑仑、氧化亚氮、异氟醚、地氟醚、七氟醚、氯胺酮、安定、丙泊酚等。然而由于伦理等原因,临床试验很难进行。本实验以大鼠为模型,使用了两种麻醉镇静药物,以观察两种药物对幼年动物神经损伤及成年后学习记忆能力的影响,以帮助临床选择对幼年相对更为安全的麻醉镇静药物。水迷宫是现今国际上常用的评估大鼠空间学习记忆的模式。实验程序包括:(1)PNT 用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆获取能力。潜伏期越短,说明学习记忆能力越好。(2)SPT 用于测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置记忆的保持能力。相同时间内,通过原平台次数越多,说明学习记忆能力越好。

NSE 是一种 77 型烯醇化酶,存在于中枢神经细胞及神经内分泌细胞胞质内。S100β 蛋白是一种高度酸性钙结合蛋白,其中 S100β 蛋白为神经组织所特有,它存在于中枢神经星形胶质细胞。当神经细胞和神经胶质膜受损时,NSE 和 S100β 蛋白可释放至细胞外间隙,通过受损的血脑屏障进入脑脊液和血液,因而测定其变化可以反映中枢神经损伤。脑脊液中 NSE 和 S100β 蛋白的变化与患者的年龄、性别有关,而血液中的变化与年龄、性别无关。S100β 蛋白、NSE 是目前常用检测脑损伤及脑功能损伤指标^[12-13]。本研究之所以同时检测 NSE 和 S100β 蛋白,是因为二者分别代表神经细胞及胶质细胞损伤程度。

咪达唑仑是目前临床常用的镇静药物,但有研究表明幼年大鼠一次皮下注射 9 mg/kg 咪达唑仑就可以造成大脑神经凋亡明显加快^[14]。本研究发现按临床剂量使用咪达唑仑连续 3 次,在大鼠成年后出现学习记忆能力下降,说明咪达唑仑可对幼年大鼠智力发育产生不可逆损伤。

Dex 是选择性 α2 受体抑制剂,对 α2 受体具有高选择性。与丙泊酚和苯二氮革类等传统镇静药不同,Dex 产生镇静作用的主要部位不在脑皮质,镇静效果也不需要激活 γ-氨基丁酸(GABA)系统。因此,Dex 产生一种类似于正常睡眠的“可唤醒”的镇静状态或称为“合作”的镇静状态:患者被有效的镇静,同时又容易被唤醒,唤醒刺激一旦撤除,患者又回到镇静状态。现已明确,Dex 通过作用于蓝斑核(lcuos cruleus,LC)发挥镇静催眠效应,主要通过作用于脊髓后角发挥抗伤害性感受、效应,通过作用于外周及中枢共同发挥抗交感活性效应。现大量动物实验认为其具有记忆保护作用。有研究表明,术前 2.5 μg/kg 的 Dex 肌肉注射可以产生与 0.08 mg/kg 的咪达唑仑相当的镇静、抗焦虑效果。本研究发现,按临床剂量使用咪达唑仑连续 3 次,在大鼠成年后未出现学习记忆能力下降,说明 Dex 对幼年大鼠智力发育影响较小。

综上所述,相比于咪达唑仑,新型麻醉镇静药物 Dex 对幼儿动物神经细胞损伤及成年后学习记忆功能的影响较小,可能更适合儿童使用。

参考文献:

- [1] James C, Eisenach MD. Anesthesia and neurodevelopment in children. Time for an answer[J]. *Anesthesiology*, 2008, 109(5):757-761.
- [2] Cottrell M, James E, Hartung L, et al. Developmental disability in the young and postoperative cognitive dysfunction in the elderly after anesthesia and surgery: do data justify changing clinical practice[J]. *Mount Sinai J Med*, 2012, 79(1):75-94.
- [3] Wiklund E, Andreas M, Granon C, et al. Object memory in young and aged mice after sevoflurane anaesthesia[J]. *Neuroreport*, 2009, 20(16):1419-1423.
- [4] Robert T, Wilder MD, Randall P, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4):796-804.
- [5] Cor J, Kalkman MD, Marcel Bruens RN. Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4):805-812.
- [6] Robert D, Sanders B, Jing X, et al. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4):1077-

1085.

- [7] Nunez J, Morris water maze experiment[J]. *J Vis Exp*, 2008, 24(19):897-905.
- [8] Moiler JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, et al. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly IS-POCD1 study[J]. *Lancet*, 1998, 351(5):857-861.
- [9] Ologunde R, Ma D. Do inhalational anesthetics cause cognitive dysfunction[J]. *Acta anaesthesiologica Taiwanica*, 2011, 49(4):149-153.
- [10] Mellon D. Use of anesthetic agents in neonates and young children[J]. *Pediatric Anesthesia*, 2007, 10(4):509-520.
- [11] Mccann D, Mary E, Bellinger C, et al. Clinical research approaches to studying pediatric anesthetic neurotoxicity[J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(5):766-771.
- [12] 蔡娜莉,付亚林. NSE 和 S-100 蛋白的检测在判断新生儿脑损伤预后中的临床应用价值[J]. *中国妇幼保健*, 2012, 27(22):3512-3514.
- [13] 黄建辉,吴海雄. 急性脑梗死患者血清 hs-CRP 和 S-100 β 蛋白水平动态检测及其临床意义[J]. *临床合理用药杂志*, 2012, 5(20):9-10.
- [14] Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 146(2):189-197.

(收稿日期:2013-02-08 修回日期:2013-04-03)

(上接第 2965 页)

- 骨折围术期应用低分子肝素预防下肢深静脉血栓的研究[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2010, 25(2):164-165.
- [4] 张福明,孔祥瑞,刘德政,等. 低分子肝素钙防治老年下肢骨折术后深静脉血栓形成 86 例[J]. *中国药业*, 2010, 19(11):57.
- [5] Struijk MC, Van Wijhe W, Sze YK, et al. Death and venous thromboembolism after lower extremity amputation[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(12):2680-2684.
- [6] 张津生,葛展时. 低分子肝素钙防治下肢骨折后深静脉血栓形成 116 例[J]. *天津医药*, 2008, 36(10):820.
- [7] 曲洪雪,刘云鹏. 骨科深静脉血栓形成危险因素及发病机制的研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(2):110-112.
- [8] 曹娟,王金玲,张环. 动静脉脉冲系统与低分子肝素钙联合应用预防全膝关节置换术后深静脉血栓[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(5):538-540.
- [9] 高雷,郭大乔,颜骅. 低分子肝素钙联合疏血通治疗急性下肢深静脉血栓的疗效观察[J]. *上海医药*, 2012, 33(20):33-35.
- [10] 靳红兵. 低分子肝素用于预防老年髋部手术围术期血栓事件的临床观察[J]. *河南外科学杂志*, 2011, 17(2):94-95.

- [11] 高玉华,马涛,施伟忠. 关节置换术患者椎管内麻醉和全身麻醉术后并发症发生情况比较的 Meta 分析[J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(4):406-408.
- [12] Appelros P. Changes in mini mental state examination score after stroke: lacunar infarction predicts cognitive decline[J]. *Eur J Neurol*, 2006, 13(5):491-495.
- [13] 马俊,沈彬,杨静. 人工全髋关节置换术后下肢深静脉血栓形成的危险因素分析[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(13):965-969.
- [14] 孙宁,李宇能,刘亚波. 术前下肢骨折患者中深静脉血栓的发生率及危险因素分析[J]. *山东医药*, 2010, 50(44):34-35.
- [15] Weusten AJ, Khan SK, Bonczek SJ, et al. Internal fixation of a traumatic fracture around a hip resurfacing arthroplasty using the proximal femoral locking compression plate[J]. *Acta Orthop Belg*, 2012, 78(5):688-693.
- [16] Kim JG, Lim HC, Kim HJ, et al. Delayed detection of clinically significant posterior cruciate ligament injury after peri-articular fracture around the knee of 448 patients[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2012, 132(12):1741-1746.

(收稿日期:2013-03-08 修回日期:2013-04-22)