

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.005

中脑腹侧被盖区多巴胺神经元在全身麻醉中的作用研究*

刘程曦,谭丹丹,李 佳,张 益[△]

(遵义医学院麻醉系,贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 探讨中脑腹侧被盖区(VTA)多巴胺神经元在全身麻醉诱导和苏醒中的作用。**方法** 成年健康雄性 SD 大鼠 40 只,分为毁损组($n=20$)和对照组($n=20$),毁损组在双侧 VTA 给予特异性多巴胺神经元毁损药 6-羟多巴胺(6-OHDA)减少多巴胺神经元,对照组在双侧中脑腹侧被盖区给予等量生理盐水。待手术后两周,观察在全身麻醉下,大鼠翻正反射消失时间(LORR)和恢复时间(RORR)。**结果** 与对照组相比,在丙泊酚麻醉下可显著缩短大鼠 LORR($P<0.05$),且明显延长大鼠 RORR($P<0.05$)。在异氟醚麻醉下毁损组与对照组相比,大鼠 LORR,差异无统计学意义($P>0.05$),但大鼠 RORR 延长($P<0.05$)。**结论** VTA 多巴胺神经元在不同的全身麻醉药的诱导和苏醒发挥着有不同作用。

[关键词] 丙泊酚麻醉;异氟醚麻醉;中脑腹侧被盖区;多巴胺神经元;翻正反射

[中图分类号] R614.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2320-03

Research on effect of midbrain VTA dopaminergic neurons in general anesthesia*

Liu Chengxi, Tan Dandan, Li Jia, Zhang Yi[△]

(Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of dopaminergic neurons of midbrain ventral tegmental area(VTA) in general anesthesia. **Methods** Forty adult healthy male SD rats were randomly divided into lesion group ($n=20$) and control group ($n=20$). The lesion group was given the bilateral infusion of specific dopaminergic neuron injury agent 6-OHDA in midbrain lateral VTA, while the control group received the same volume of normal saline at the same areas. The time of loss of righting reflex (LORR) loss and recovery of righting reflex(RORR) at postoperative 2 week were observed in each group. **Results** Compared with the control group, the LORR time in the lesion group was shortened and the RORR time was significantly prolonged under propofol-induced anesthesia ($P<0.05$). However, the LORR time under the isoflurane anesthesia had no statistically significant difference between the two groups($P>0.05$), while the RORR time in the lesion group was increased($P<0.05$). **Conclusion** Dopaminergic neurons in midbrain VTA might play different roles in the induction and recovery of different general anesthetics.

[Key words] propofol; isoflurane; midbrain ventral tegmental area; dopaminergic neurons; righting reflex

全身麻醉目前已经普遍应用于临床,丙泊酚是近年临床上应用最为广泛的静脉麻醉药,具有诱导快,作用时间短,代谢快,以及脑保护作用等优点。异氟醚则是最常用的吸入麻醉药,有肌肉松弛作用,几乎以原型排除。但有报道苏醒延迟在全身麻醉中常有发生,全身麻醉下延迟苏醒与年龄^[1]、体质量^[2]等相关,并且会引起一系列的术后并发症^[3-4]。中脑腹侧被盖区(VTA)是脑内主要的多巴胺能神经核团,也是涉及睡眠和觉醒的重要核团之一^[5-7]。然而其是否参与全身麻醉过程少见报道。因此,本实验拟通过毁损 VTA 多巴胺神经元,观察其对全身麻醉作用的影响,探讨 VTA 多巴胺神经元在全身麻醉中诱导和苏醒的作用,有助于临床麻醉促清醒药物的研发,减少麻醉的并发症。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF 级成年雄性 SD 大鼠 40 只,250~300 g,购买于第三军医大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(渝)2007-0005。在 SPF 级动物中心常规饲养 1 周后分为毁损组和对照组,24 h 人工光照,自由饮水进食。

1.2 实验药物 1% 丙泊酚(阿斯利康公司,国药准字 H20030427)、6-羟多巴胺(6-DHDA, Sigma, H4381)、一抗:兔来源酪氨酸羟化酶(Abcam, ab6211)、二抗:CY3 驴抗兔 IgG (BioLegend, B171524)、DAB 显色液:HRP/DAB (ABC) 免疫组织化学试剂盒(Abcam, ab64264)。

1.3 方 法

1.3.1 动物模型建立 10% 戊巴比妥 45 mg/kg 腹腔注射麻醉后,大鼠固定于脑立体定位仪,切开头皮暴露颅骨,根据大鼠脑立体定位图谱(Watson and Paxinos)定位 VTA,前后: +5.5 mm,内外: ±0.6 mm,腹背: -7.8 mm,并行颅骨钻孔术,暴露硬脑膜并轻轻拨开,将套管针缓慢放置到两侧核团内,微量注射泵(RWD202,深圳瑞沃德公司)分别给实验组 1 μL 的 6-OHDA (5 μg/μL),对照组生理盐水 1 μL。注射完毕后停留 10 min,待药物完全扩散并防止药物溢出,再拔出注射内管,缝皮,术毕连续 3 d 肌内注射青霉素 20 U 预防感染。待术后恢复 14 d 开始实验。所以模型试验结束后均需进行组织学定位。

1.3.2 实验流程 (1)丙泊酚麻醉前准备:将大鼠置于诱导盒中,异氟醚麻醉,暴露尾静脉,静脉留置针置入大鼠尾静脉,固定尾静脉针后,用延长管连接装有丙泊酚的注射器,置于 TCI 靶控麻醉泵(WZS-50F6,史密斯公司)。待大鼠恢复 30 min 后进行丙泊酚麻醉。(2)诱导麻醉:丙泊酚麻醉,以 $6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的诱导剂量持续泵注丙泊酚,从给药开始记录时间,至大鼠翻正反射消失,为大鼠翻正反射消失时间(LORR)。异氟醚麻醉:将大鼠放入诱导盒 1.5% 的异氟醚持续通气,气体监护仪持续测异氟醚浓度维持在 1.5%,记录大鼠的 LORR。(3)麻醉苏醒,丙泊酚:大鼠翻正反射消失后再继续泵注 20 min,从停药瞬间记录时间,直至大鼠翻正反射恢复,为大鼠翻正反射恢复时间(RORR)。异氟醚:大鼠翻正反射消失,继续维持 30 min,从停药瞬间记录时间,记录大鼠 RORR。对照组与毁损组方法均为以上步骤。

翻正反射消失:为将药物注射完毕后,将大鼠置于屈膝仰卧位,大鼠在 30 s 内不能从仰卧位变为俯卧位。翻正反射恢复的定义为老鼠置于俯卧位时,5 s 内能够恢复四脚着地。翻正反射恢复:大鼠在俯卧位时,5 s 内能够恢复正常的体位,即四脚同时着地。

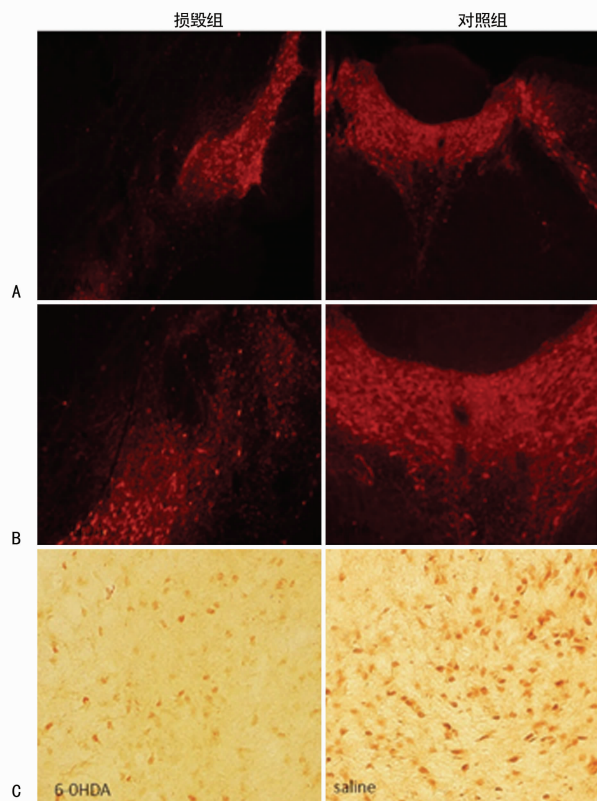
1.3.3 免疫荧光及免疫组织化学验证 行为学实验完成后均要进行组织学验证,确定导管插入位置,定位错误,均予以剔除。(1)10%戊巴比妥钠腹腔深麻醉,剑突下取适当的切口,充分暴露大鼠心脏,4%的多聚甲醛灌流,固定脑组织,灌流结束后断头,咬除颅骨,充分暴露大鼠的脑组织并将其取出。(2)免疫荧光法:冰冻切片-血清封闭 1 h-多巴胺神经元特异性一抗孵育过夜-荧光二抗 CY3 孵育 2 h-封片-荧光显微镜观察。按照大鼠脑定位图谱切片,观察毁损组与对照组荧光强度及定位是否在 VTA 区。(3)免疫组织化学:冰冻切片-3%双氧水封闭 30 min-血清封闭 1 h-一抗孵育过夜-二抗孵育 20 min-DAB 显色-乙醇脱水-封片-显微镜下观察。(4)荧光显微镜(BX51W1-IR7 显微镜,日本 Olympus 公司)下鉴定多巴胺神经元及定位。(5)免疫组织化学毁损率计算:注射内管位置正确的大脑,连续切片,每 5 张选取 1 张,每只大鼠选取 10 张片子,并进行免疫组织化学,观察左右两侧 VTA 多巴胺神经元并使用 IPP 软件进行细胞计数。

1.4 统计学处理 统计学分析采用 SPSS20.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫免疫荧光定位及免疫组化定量 免疫荧光鉴定多巴胺神经元及给药位置定位。与注入生理盐水组对比,毁损组注入 6-OHDA 双侧 VTA 多巴胺神经元数量显著降低,毁损率达 69%。见图 1。

2.2 大鼠 LORR 和 RORR 在丙泊酚麻醉下,毁损组与对照组的 LORR 相比,毁损组大鼠 LORR 明显缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组的 RORR 为相比,毁损组大鼠 RORR 显著延长($P < 0.05$),见表 1;在异氟醚麻醉下,毁损组 LORR 与对照组的 LORR,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组的 RORR 为相比,毁损组大鼠 RORR 明显增加($P < 0.05$),见表 2。



A: VTA 免疫荧光染色;B:毁损组和对照组 VTA 免疫荧光 40 倍放大图;C: VTA 免疫组织化学。

图 1 免疫荧光及免疫组化结果图

表 1 丙泊酚麻醉下 LORR 和 RORR 结果比较($\bar{x} \pm s, \text{min}$)

组别	n	LORR	RORR
对照组	20	20.67 ± 2.71	11.68 ± 3.02
毁损组	20	15.14 ± 1.08*	15.94 ± 1.96*

*: $P < 0.05$, 与对照组相比。

表 2 异氟醚麻醉下 LORR 和 RORR 结果比较($\bar{x} \pm s, \text{s}$)

组别	n	LORR	RORR
对照组	20	145.20 ± 31.01	185.50 ± 23.61
毁损组	20	194.10 ± 49.57	244.40 ± 46.90*

*: $P < 0.05$, 与对照组相比。

3 讨 论

VTA 在行为、动机、奖赏、药物的成瘾及觉醒等发挥着重要的作用^[8-11]。但早年有报道发现,VTA 的多巴胺神经元在麻醉过程中放电频率没有改变^[12]。然而近年有研究报道,多巴胺通路参与调节果蝇睡眠-觉醒过程^[13]。本研究中,多巴胺受体的激动剂能使大鼠在异氟醚麻醉中苏醒时间显著缩短^[2,14]。且 Solt 等^[15]在异氟醚麻醉下给予 VTA 电刺激,有促觉醒作用。但对于 VTA 多巴胺神经元在全身麻醉中的作用目前研究仍较少。

本研究运用脑区微注射技术,特异性毁损 VTA 多巴胺神经元,观察 VTA 多巴胺神经元对丙泊酚全身麻醉的影响。结果提示 VTA 多巴胺神经元减少后,丙泊酚麻醉诱导时间显著缩短,并且大鼠苏醒时间明显延长。这一结果说明 VTA 的多

多巴胺神经元在丙泊酚麻醉中有促进觉醒及拮抗睡眠的作用。近期研究结果提示丙泊酚可能借助于睡眠-觉醒通路产生麻醉状态^[16]。而 VTA 的多巴胺神经元对脑内睡眠-觉醒通路的关键核团如:中缝背核、蓝斑核、脑桥脚区、丘脑等均有相互投射,这些联系也提示 VTA 的多巴胺能神经元与睡眠-觉醒有着密切的关系^[2,17]。本实验结果显示大鼠的 RORR 明显延长,本研究分析其中的机制可能是由于 VTA 的多巴胺神经元减少,以 VTA 为核心的多巴胺觉醒通路的兴奋性降低及其对投射至促觉醒核团如蓝斑核、基底前脑区域释放的多巴胺减少,VTA 对大鼠觉醒作用减弱,故在丙泊酚麻醉下大鼠 RORR 明显延长。

本实验通过毁损 VTA 的多巴胺神经元,在丙泊酚 $6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (参考本实验室前期实验)麻醉下不仅延长大鼠苏醒时间并且减少大鼠诱导时间。Nieh 等^[9]研究认为 VTA 内的 30% 的 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元与多巴胺能神经元活动存在平衡状态,特异性抑制 VTA 的 GABA 神经元,使多巴胺神经元占主导地位,可促进大鼠的机体活动。而在 VTA 微注射 GABA 受体激动剂兴奋 GABA 神经元,能明显增强全身麻醉的作用^[18]。本实验中,毁损 VTA 多巴胺神经元后,平衡状态被打破,GABA 能神经活动占主导作用,对大鼠觉醒通路的抑制增强,因而更易进入睡眠状态。

在 1.5% 异氟醚^[15]麻醉中损毁 VTA 的多巴胺神经元仅延长大鼠的 RORR,对 LORR 无明显影响。近期研究均表明,兴奋 VTA 在异氟醚麻醉中有促苏醒的作用,但不改变麻醉诱导时间^[2,14-15]。丙泊酚与异氟醚是不同类型的麻醉药物,丙泊酚是主要受体为 GABAA 受体,甘氨酸受体等发挥作用,而异氟醚则是通过 K^+ 通道和 GABAA 受体产生麻醉效应,其作用的机制有异同,也可能是本实验产生不同结果的原因。

综上所述,VTA 的多巴胺能神经元在麻醉的苏醒和诱导过程中具有重要的作用,但限于全身麻醉机制的作用位点的多样性及大脑中枢的复杂性,VTA 及其相关通路在全身麻醉中的具体作用还有待更深入的研究。

参考文献

- Chemali JJ, Kenny JD, Olutola O, et al. Ageing delays emergence from general anaesthesia in rats by increasing anaesthetic sensitivity in the brain [J]. *Br J Anaesth*, 2015, 115(1):58-65.
- Chidambaram V, Sadhasivam S, Diepstraten J, et al. Evaluation of propofol anesthesia in morbidly obese children and adolescents [J]. *BMC Anesthesiol*, 2013, 13(1):8.
- Kozasa Y, Takaseya H, Koga Y, et al. A case of delayed emergence from anesthesia caused by postoperative brain edema associated with unexpected cerebral venous sinus thrombosis [J]. *J Anesth*, 2013, 27(5):764-767.
- 蒋奕红, 谢景远, 熊威威, 等. 血清 S100 β 蛋白水平与丙泊酚及依托咪酯麻醉后幼儿早期认知功能障碍的相关性研究 [J]. *医学研究生学报*, 2015, 28(8):824-828.
- Taylor NE, Chemali JJ, Brown EN, et al. Activation of D1 dopamine receptors induces emergence from isoflurane general anesthesia [J]. *Anesthesiology*, 2013, 118(1):30-39.
- Gomperts SN, Kloosterman F, Wilson MA. VTA neurons coordinate with the hippocampal reactivation of spatial experience [J]. *Elife*, 2015, 4(1):11.
- Monti JM, Monti D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking [J]. *Sleep Med Rev*, 2007, 11(2):113.
- Bocklisch C, Pascoli V, Wong JC, et al. Cocaine disinhibits dopamine neurons by potentiation of GABA transmission in the ventral tegmental area [J]. *Science*, 2013, 341(6153):1521-1525.
- Nieh EH, Matthews GA, Allsop SA, et al. Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking [J]. *Cell*, 2015, 160(3):528-541.
- Edward N, Caitlin M, Weele V, et al. Inhibitory input from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area disinhibits dopamine neurons and promotes behavioral activation [J]. *Neuron*, 2016, 90(6):1286.
- Oliva I, Wanat MJ. Ventral tegmental area afferents and drug-dependent behaviors [J]. *Front Psychiatry*, 2016, 7(10):30.
- Miller JD, Farber J, Gatz P, et al. Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and waking in the rat [J]. *Brain Res*, 1983, 273(1):133-141.
- Ueno T, Tomita J, Tanimoto H, et al. Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila* [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(11):1516-1523.
- Solt K, Cotten JF, Cimenser A, Wong KF. Methylphenidate actively induces emergence from general anesthesia [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(4):791-803.
- Solt K, Van Dort CJ, Chemali JJ, et al. Electrical stimulation of the ventral tegmental area induces reanimation from general anesthesia [J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(2):311-319.
- Murphy M, Bruno MA, Riedner BA, et al. Propofol anesthesia and sleep: a high-density EEG study [J]. *Sleep*, 2011, 34(3):283-291.
- Urbano FJ, Bisagno V, Gonzalez B, et al. Pedunculopontine arousal system physiology-effects of psychostimulant abuse [J]. *Sleep Sci*, 2015, 8(3):162-168.
- Ma J, Leung LS. Limbic system participates in mediating the effects of general anesthetics [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31(6):1177-1192.