

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.09.002

丙泊酚通过降低眶额叶皮层神经元兴奋性下调大鼠认知功能研究*

杨明友¹, 张超¹, 叶建宁², 张铭¹, 易斌¹, 鲁开智¹, 王文聪^{1,3△}

(1. 中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院手术麻醉科, 重庆 400038; 2. 中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院神经内科, 重庆 400038; 3. 三博江陵医院麻醉科, 重庆 400021)

摘要:目的 探讨丙泊酚对眶额叶皮层兴奋性及相关学习记忆功能的影响。方法 采用神经药理学方法在眶额叶皮层微注射丙泊酚, 检测大鼠在T-迷宫中的反转学习记忆功能及开场实验中运动、情绪和探索动机的变化; 通过免疫组化检测c-fos表达, 观测丙泊酚对眶额叶皮层神经元兴奋性的影响。结果 眶额叶皮层微注射丙泊酚后, 大鼠在T-迷宫中的学习记忆能力下降($P < 0.05$); 开场实验中眶额叶微注射丙泊酚未影响大鼠的运动、情绪及探索能力($P > 0.05$); 丙泊酚可显著抑制眶额叶皮层c-fos表达。结论 丙泊酚可直接抑制眶额叶皮层神经元的活动, 引起学习记忆能力下调, 表明眶额叶皮层是丙泊酚发挥麻醉效应的重要靶区。

关键词: 丙泊酚; 眶额叶皮层; 反转学习记忆; 认知功能; 大鼠

中图分类号: R965; R971⁺.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)09-0005-04

Propofol Down-Regulates the Cognitive Function in Rats via Inhibiting the Neuronal Excitability of the Orbitofrontal Cortex

YANG Mingyou¹, ZHANG Chao¹, YE Jianning², ZHANG Ming¹, YI Bin¹, LU Kaizhi¹, WANG Wencong^{1,3}

(1. Department of Anesthesiology, The First Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing, China 400038; 2. Department of Neurology, The Second Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing, China 400038; 3. Department of Anesthesiology, Sanbo Jiangling Hospital, Chongqing, China 400021)

Abstract: Objective To investigate the effect of propofol on the excitability of orbitofrontal cortex and related learning and memory function. **Methods** Propofol was microinjected into the orbitofrontal cortex by means of neuropharmacology. T-maze was used to detect the reversal learning and memory function, and the open field test was used to detect the changes in animals' locomotor, emotion and exploratory activities. The expression of c-fos was detected by immunohistochemistry to observe the effect of propofol on the neuronal excitability of the orbitofrontal cortex. **Results** After microinjection of propofol into the orbitofrontal cortex, the learning and memory abilities of rats in T-maze decreased ($P < 0.05$). Microinjection of propofol into the orbitofrontal cortex did not affect the locomotor, emotion and exploratory activities of rats in the open field test ($P > 0.05$). Propofol could significantly inhibit the expression of c-fos in the orbitofrontal cortex. **Conclusion** Propofol can down-regulate learning and memory function via directly inhibiting the neuronal activity in the orbitofrontal cortex, which indicates that the orbitofrontal cortex is the important target for propofol to exert anesthetic effect.

Key words: propofol; orbitofrontal cortex; reverse learning and memory; cognitive function; rats

丙泊酚是临床常用静脉麻醉药物^[1-3]。研究表明, 丙泊酚麻醉后受试者不能维持觉醒, 表现出学习记忆和决策等认知功能下调^[4-6]。目前, 丙泊酚麻醉如何下调学习记忆功能的神经机制尚不完全清楚。有研究表明, 丙泊酚可直接作用于学习记忆相关的海马和内嗅皮层脑区。在海马区, 丙泊酚可抑制神经元兴奋性, 降低突触传递效率和可塑性, 并抑制乙酰胆碱递质释放^[7-11]; 同时, 下调内嗅皮层神经元的活动^[12]。眶额叶皮层兴奋性与觉醒程度密切相关, 并对学习记忆、决策及执行功能起重要作用。在灵长类和啮齿类动物中, 损毁眶额叶皮层可损害动物的反转学习记忆功能和认知的灵活性^[13-16]。采用正电子计算机断层(PET)技术监测人脑活动, 发现丙泊酚麻醉率先使眶额叶皮层活动下降, 而对其他新皮层作用较小^[17], 提示眶额叶与丙泊酚麻醉密切相关。本

研究中通过神经药理学、免疫组化及行为学检测方法, 探讨在眶额叶皮层微注射丙泊酚对学习记忆功能及神经元活动的影响, 以期进一步阐明丙泊酚麻醉效应, 特别是麻醉中认知下调的神经机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

动物与分组: 健康雄性SD大鼠26只, 2个月月龄, 清洁级, 体质量250~300g, 雄性, 购于陆军军医大学动物中心, 动物合格证号为SCXK(渝)-PLA-20160011, 实验操作符合陆军军医大学动物伦理规范。行为实验中, 共使用26只大鼠: 14只大鼠随机分为2组(溶剂对照组和丙泊酚处理组, 各7只, 用于T-迷宫实验监测反转学习记忆; 12只大鼠随机分为2组(溶剂对照组和丙泊酚处理组, 各6只, 用于开场实验。

*基金项目: 国家自然科学基金青年项目[81571161]。

第一作者: 杨明友, 男, 大学本科, 研究方向为丙泊酚麻醉影响认知功能的机制, (电子信箱) yangmingyoutmmu@163.com。

△通信作者: 王文聪, 女, 大学本科, 研究方向为丙泊酚麻醉影响认知功能的机制, (电子信箱) 27189623@qq.com。

试剂:丙泊酚(批号为56931,分析纯,纯度 $\geq 98\%$),多聚甲醛(批号为16005,纯度 $\geq 98\%$),4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI),批号为D9542,纯度 $\geq 98\%$),均购于美国Sigma公司;c-fos免疫组化染色的一抗(批号为ab208942)和二抗(批号为ab150113)均购于英国Abcam公司。

仪器:IVM-1000型微量注射泵(英国Scientifica);T-迷宫行为检测装置及配套动物轨迹视频追踪系统,开场行为检测设备及配套动物轨迹视频追踪系统(中国上海欣软信息科技有限公司);CM1900型冰冻切片机(德国Leica公司);脑立体定位仪(中国深圳瑞沃德公司)。

1.2 方法

1.2.1 埋置给药导管及微量给药

将大鼠用3%戊巴比妥钠进行麻醉(每100 g体质量0.25 mL,腹腔注射),置脑立体定位仪,用酒精和碘伏消毒后,剪开颅骨表面皮肤及去除软组织,暴露颅骨。用过氧化氢擦拭颅骨表面,暴露前囟和后囟点。明确眶额叶额叶皮层定位坐标(anteroposterior: +3.7 mm, middle-lateral: ± 2.5 mm, dorsoventral: -4.0 mm)。根据上述坐标,用牙科钻制作下导管的骨孔,在骨孔周围安装固定螺丝,完成后用微推将导管(中国深圳瑞沃德公司)埋植于眶额叶皮层。用牙科水泥将固定螺丝和导管固定。手术完成后,将大鼠置饲养笼恢复,恢复5~7 d后进行T-迷宫或开场实验检测。

采用微量注射泵进行微量给药,在眶额叶给药体积为0.5 μ L,丙泊酚的浓度为50 μ mol/L^[12,18]。微量给药速度为每2 min 0.5 μ L,给药完成后留针2 min,使药物扩散。给药后15 min进行T-迷宫或开场实验检测。

1.2.2 T-迷宫检测反转学习记忆能力

限食:训练前4 d进行食物摄取限制(每天给予大鼠约10~15 g食物),使大鼠体质量降至85%。

环境适应:在动物进行限食过程中,同时让大鼠在T迷宫中适应,让动物在撒有食物粒的T迷宫中自由探索8~10 min。

T-迷宫测试:T-迷宫主要由1个中心臂及2个选择臂构成(各臂长50 cm,宽20 cm)。共训练10 d,前6 d将食物固定于T-迷宫的左侧,每天进行10次训练,每次间隔30 s。训练时让大鼠从中央臂的起点出发到左右的选择臂寻找食物(放于选择臂末端)。训练6 d后,将食物放于T-迷宫的右侧,继续训练4 d。每次训练前,眶额叶皮层给予溶剂或丙泊酚,给药15 min后进行训练。动物若能准确找到食物,记录1次正确的选择;反之,则记录为1次错误的选择。

1.2.3 开场实验

开场为1 m $\times$ 1 m $\times$ 1 m的盒子(开口、黑色)。每只

大鼠仅接受1次测试,测试前15 min在眶额叶皮层给药。大鼠放于开场中心区域,自由探索5 min。利用视频追踪系统检测大鼠在开场中的运动距离、站立次数、进入中心区域的次数及距离。

1.2.4 导管埋置位点检测

完成行为检测后,采用生理盐水(37 $^{\circ}$ C)+4%多聚甲醛(4 $^{\circ}$ C)进行灌注和固定。灌注固定后取脑组织。大脑在4%多聚甲醛中固定,完成后转移至30%蔗糖+4%多聚甲醛溶液中进行脱水。脑组织沉底后,进行冰冻切片(厚度40 μ m)。按冠状面对眶额叶皮层连续切片,对切片进行DAPI染色。完成后进行封片,在荧光显微镜下检测导管埋置位置是否位于眶额叶皮层。导管埋置不准大鼠不纳入统计。

1.2.5 c-fos免疫组织化学荧光染色

按照1.2.1项下方法操作,在眶额叶皮层微量注射溶剂和丙泊酚。为排除眶额叶皮层自身昼夜节律影响,注射溶剂和丙泊酚在固定时间点(19:00)。完成注射90 min后,按照1.2.4项下方法进行灌注固定。将脑组织置4%多聚甲醛外固定过夜,30%蔗糖[磷酸缓冲盐溶液(PBS)配置]脱水过夜。切片30 μ m,PBS中保存。一抗染色,浓度1:200,4 $^{\circ}$ C 24 h,室温2 h,PBS漂洗10 min,共3次。DAPI染色5 min,1 $\times$ PBS漂洗10 min 1次,二抗避光染色,浓度为1:200,2 h,1 $\times$ PBS漂洗10 min 3次。贴片后80%甘油封片,显微镜下观察眶额叶皮层c-fos的表达。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0和Sigma Plot软件分析。计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示,采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 引起大鼠反转学习能力受损

采用T-迷宫检测大鼠反转学习记忆能力(图1A)。前6 d,将食物固定于T-迷宫的左侧臂,随着训练的天数增加,大鼠在T-迷宫中选择正确率亦逐渐增加;第6天,两组动物选择的正确率均达到80%(图1B);随后,检测大鼠反转学习记忆能力,在眶额叶皮层给药后,大鼠在反转学习过程中选择正确率显著低于对照组动物(图1B),表明丙泊酚可作用于眶额叶皮层损害大鼠的反转学习记忆能力。

2.2 对大鼠运动、探索动机和情绪行为无明显效应

反转学习也可能受到非特异性因素的干预,如情绪和探索动机。眶额叶皮层微注射丙泊酚对大鼠在开场中的运动距离和站立次数无明显效应(图2A至图2C),表明丙泊酚在眶额叶皮层并不影响大鼠的运动功能和探索行为。同时,眶额叶皮层给予丙泊酚不影响大鼠进

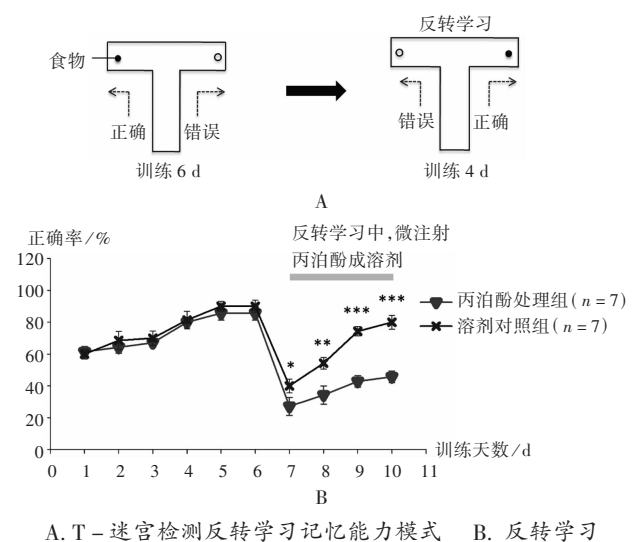


图1 眶额叶皮层微注射丙泊酚对大鼠反转学习记忆能力的损害

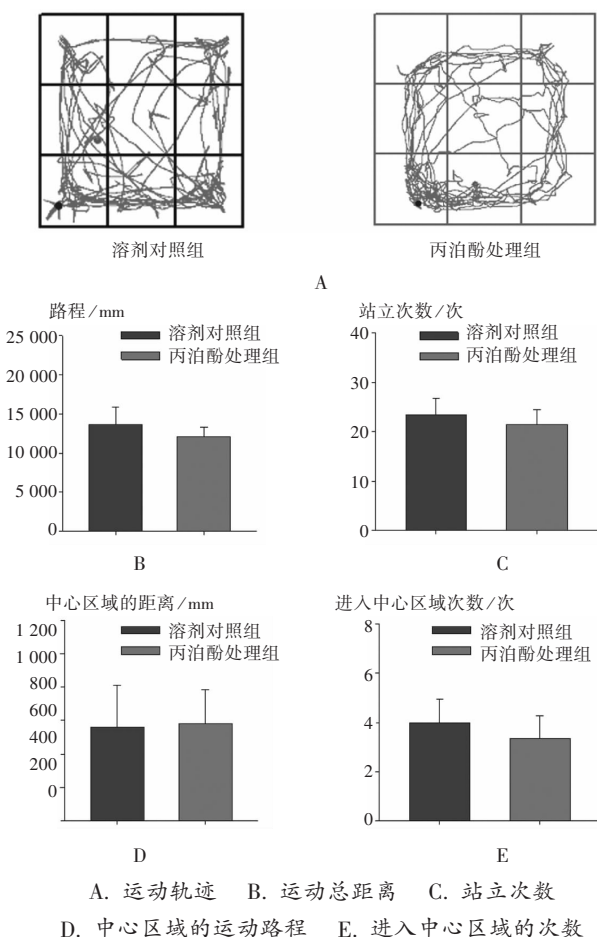
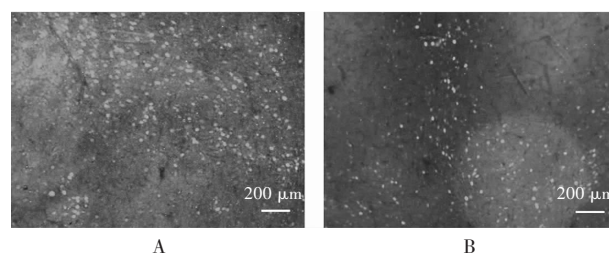


图2 眶额叶皮层微注射丙泊酚对大鼠在开场中的运动距离和站立次数影响

入开场中心区域的次数和运动距离(图2D至图2E),表明大鼠的焦虑情绪行为未受到影响。

2.3 可降低眶额叶皮层神经元的兴奋性

采用免疫组化检测 c-fos 蛋白表达,分析给药后眶额叶皮层神经元兴奋性的变化。给药后眶额叶皮层荧光信号较弱,且 c-fos 阳性神经元的数量显著减少(图3),



A. 溶剂对照组 B. 丙泊酚处理组

图3 各组动物眶额叶皮层 c-fos 免疫组化染色结果(免疫组织化学荧光染色, ×200)

表明丙泊酚可直接抑制眶额叶皮层神经元的兴奋性。

3 讨论

丙泊酚麻醉导致觉醒不能维持,表现为认知功能严重下调。在眶额叶局部微注射丙泊酚引起大鼠在 T-迷宫中的正确选择率严重下降;开场实验中,眶额叶皮层微注射丙泊酚对大鼠的运动、情绪和探索动机无明显效应,可引起 c-fos 阳性神经元数量减少。结果表明,丙泊酚可直接抑制眶额叶皮层兴奋性,引起警觉及认知功能下调。

眶额叶皮层主要接受体感皮层、背缝核、边缘皮层和海马的输入,主要投射至前额叶和腹侧被盖区^[19-21]。灵长类动物中,损毁眶额叶皮层动物在学习记忆任务中选择的错误次数增多。啮齿类动物中,抑制或损毁眶额叶皮层可造成反转学习记忆或认知的灵活性受损^[13,22]。反转学习与眶额叶皮层神经元放电编码模式和神经元集群网络振荡密切相关。采用多通道记录技术监测眶额叶皮层神经元的放电,发现在反转学习过程中,眶额叶皮层神经元放电能表征环境信号所预测的结果^[23-24]。通过 c-fos 标记技术发现,丙泊酚可能是通过下调眶额叶皮层的神经元兴奋,抑制神经元的特定编码模式,进而造成反转学习功能受损。

在新皮层及皮层下区域,丙泊酚可直接作用于神经元的胞体,增强神经元的钾通道或抑制超极化激活非选择性阳离子通道,产生外向电流,导致神经元发生超极化,引起兴奋性下降。丙泊酚同时可增强 GABA 型受体介导的抑制性输入,间接地抑制神经元活动^[12,18,25-27]。但本研究侧重于行为学和形态学的观察,丙泊酚调控眶额叶皮层的离子通道机制尚不清楚,还需进一步研究。

丙泊酚作为常用麻醉药物,具有起效快、苏醒快的特点,其麻醉的显著特征为认知功能下调^[4-5]。丙泊酚可直接作用于眶额叶皮层,通过抑制该脑区活动进而下调学习记忆功能,表明眶额叶皮

本栏目由
重庆赢英康医疗器械有限公司
协办

层是丙泊酚发挥麻醉效应重要的靶区。

参考文献:

- [1] CHOI GJ, KANG H, BAEK CW, et al. Comparison of bolus versus continuous infusion of propofol for procedural sedation: a meta-analysis[J]. *Curr Med Res Opin*, 2017, 33(11): 1935 – 1943.
- [2] FENG AY, KAYE AD, KAYE RJ, et al. Novel propofol derivatives and implications for anesthesia practice[J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2017, 33(1): 9 – 15.
- [3] ILYAS M, BUTT MF, BILAL M, et al. A Review of Modern Control Strategies for Clinical Evaluation of Propofol Anesthesia Administration Employing Hypnosis Level Regulation[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 7432310.
- [4] PANG R, QUARTERMAIN D, ROSMAN E, et al. Effect of propofol on memory in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1993, 44(1): 145 – 151.
- [5] SANOU J, ILBOUDO D, GOODALL G, et al. Evaluation of cognitive functions after anesthesia with propofol[J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 1996, 15(8): 1155 – 1161.
- [6] XU X, TIAN Y, WANG G, et al. Inhibition of propofol on single neuron and neuronal ensemble activity in prefrontal cortex of rats during working memory task[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 270: 270 – 276.
- [7] KAKEHATA J, TOGASHI H, YAMAGUCHI T, et al. Effects of propofol and halothane on long-term potentiation in the rat hippocampus after transient cerebral ischaemia[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2007, 24(12): 1021 – 1027.
- [8] SUN X, ZHANG J, LI H, et al. Propofol effects on excitatory synaptic efficacy in the CA1 region of the developing hippocampus[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2005, 157(1): 1 – 7.
- [9] WEI HM, XIONG WY, YANG SC, et al. Propofol facilitates the development of long-term depression(LTD) and impairs the maintenance of long-term potentiation(LTP) in the CA1 region of the hippocampus of anesthetized rats[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 324(3): 181 – 184.
- [10] KIKUCHI T, WANG Y, SATO K, et al. *In vivo* effects of propofol on acetylcholine release from the frontal cortex, hippocampus and striatum studied by intracerebral microdialysis in freely moving rats[J]. *Br J Anaesth*, 1998, 80(5): 644 – 648.
- [11] MATSUO M, AYUSE T, K OI, et al. Propofol produces anticonflict action by inhibiting 5-HT release in rat dorsal hippocampus[J]. *Neuroreport*, 1997, 8(14): 3087 – 3090.
- [12] LI XJ, PAN K, ZHU D, et al. Propofol postsynaptically suppresses stellate neuron excitability in the entorhinal cortex by influencing the HCN and TREK-2 channels[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 619: 54 – 59.
- [13] WALTON ME, BEHRENS TE, BUCKLEY MJ, et al. Separable learning systems in the macaque brain and the role of orbitofrontal cortex in contingent learning[J]. *Neuron*, 2010, 65(6): 927 – 939.
- [14] MCDANNALD MA, LUCANTONIO F, BURKE KA, et al. Ventral striatum and orbitofrontal cortex are both required for model-based, but not model-free, reinforcement learning[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(7): 2700 – 2705.
- [15] TREMBLAY L, SCHULTZ W. Relative reward preference in primate orbitofrontal cortex[J]. *Nature*, 1999, 398(6729): 704 – 708.
- [16] PADOA-SCHIOPPA C, ASSAD JA. Neurons in the orbitofrontal cortex encode economic value[J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 223 – 226.
- [17] FISET P, PAUS T, DALOZE T, et al. Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(13): 5506 – 5513.
- [18] FUNAHASHI M, HIGUCHI H, MIYAWAKI T, et al. Propofol suppresses a hyperpolarization-activated inward current in rat hippocampal CA1 neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2001, 311(3): 177 – 180.
- [19] ONGUR D, PRICE JL. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans[J]. *Cereb Cortex*, 2000, 10(3): 206 – 219.
- [20] WAY BM, LACAN G, FAIRBANKS LA, et al. Architectonic distribution of the serotonin transporter within the orbitofrontal cortex of the vervet monkey[J]. *Neuroscience*, 2007, 148(4): 937 – 948.
- [21] DEACON TW, EICHENBAUM H, ROSENBERG P, et al. Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 1983, 220(2): 168 – 190.
- [22] RICEBERG JS, SHAPIRO ML. Reward stability determines the contribution of orbitofrontal cortex to adaptive behavior[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(46): 16402 – 16409.
- [23] THORPE SJ, ROLLS ET, MADDISON S. The orbitofrontal cortex: neuronal activity in the behaving monkey[J]. *Exp Brain Res*, 1983, 49(1): 93 – 115.
- [24] ROLLS ET, CRITCHLEY HD, MASON R, et al. Orbitofrontal cortex neurons: role in olfactory and visual association learning[J]. *J Neurophysiol*, 1996, 75(5): 1970 – 1981.
- [25] INOUE Y, SHIBUYA I, KABASHIMA N, et al. The mechanism of inhibitory actions of propofol on rat supraoptic neurons[J]. *Anesthesiology*, 1999, 91(1): 167 – 178.
- [26] REHBERG B, DUCH DS. Suppression of central nervous system sodium channels by propofol[J]. *Anesthesiology*, 1999, 91(2): 512 – 520.
- [27] HIGUCHI H, FUNAHASHI M, MIYAWAKI T, et al. Suppression of the hyperpolarization-activated inward current contributes to the inhibitory actions of propofol on rat CA1 and CA3 pyramidal neurons[J]. *Neurosci Res*, 2003, 45(4): 459 – 472.

(收稿日期: 2018-11-04)