

深度麻醉至脑死亡期间 大鼠海马神经元活动的突变*

曹嘉悦 封洲燕** 郑晓静 陈白璐

(浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 生物医学工程教育部重点实验室, 杭州 310027)

摘要 全身麻醉若操作不当可能造成致命的中枢神经系统损伤, 因此其安全性受到广泛关注. 为了揭示麻醉不断加深的过程中神经元活动的变化规律, 本文研究了大鼠在乌拉坦(urethane)深度麻醉至脑死亡期间海马区神经元兴奋性和信号传导功能的变化. 利用微电极阵列记录和电刺激技术, 在海马 CA1 区胞体层分别记录 Schaffer 侧支上正向刺激和海马白质上反向刺激诱发的群峰电位(population spike, PS). 以 PS 的幅值和潜伏期为指标, 分析海马神经元活动的变化. 结果表明, 随着乌拉坦血药浓度的增加, PS 幅值逐渐减小, 潜伏期逐渐延长, 意味着乌拉坦抑制了神经元的兴奋性以及轴突传导和突触传递. 特别是这些变化存在明显的转折点(即突变), 将整个衰减过程分成慢变和快变 2 个阶段. 快变期的剧烈衰减迅速导致脑死亡. 而且, 引起突变的决定性因素可能是乌拉坦的血药浓度, 而非麻醉时间的长短. 但是, 当乌拉坦注射速率较慢时, 延长的慢变期仍然会使神经元功能的受损加重. 这些研究结果为动物实验的麻醉操作和临床麻醉的安全应用提供了重要的信息.

关键词 麻醉, 乌拉坦, 海马, 神经元, 突变

学科分类号 Q42, R338

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00144

麻醉作为现代医疗技术的重要手段之一, 用于各类外科手术以减少病人的痛苦, 保证手术的顺利进行^[1]. 全身麻醉(简称全麻)是一种重要的麻醉类型, 可以抑制病人中枢神经系统的兴奋性^[2], 使其丧失意识^[3]. 同时全麻也存在危险性, 若操作不当, 可能造成神经系统的不可逆损伤, 影响病人术后的行为和认知功能, 甚至危及生命^[4]. 因此, 深入揭示麻醉不断加深的过程中神经元活动的变化规律, 对于提高麻醉手术的安全性以及阐明全麻对大脑功能的影响机制, 都具有重要的意义. 基于此目的, 本文研究乌拉坦(Urethane)深度麻醉直至脑死亡的过程中大鼠海马神经元功能的变化.

乌拉坦属于非特异性的麻醉剂^[5, 6], 对于神经元胞体的兴奋性、轴突传导以及突触传递功能等都会造成影响. 有研究表明, 乌拉坦能够提高神经元兴奋的阈值并降低其动作电位的发放频率^[6-8], 减小电刺激诱发的群峰电位和兴奋性突触后电位^[9-12]. 而且, 麻醉剂量变化时神经元动作电位的发放模式^[13]和场电位的时频特性^[14]也会随之改变. 但是,

已有的研究多局限于常规麻醉水平, 没有阐明深度麻醉过程中临近脑死亡时神经元功能的变化.

大脑海马区是哺乳动物中枢神经系统边缘组织的一部分, 其中的神经元排列很规则, 形成清晰的神经回路结构, 在不同的神经通路上施加电刺激后可以产生特定的诱发电位波形^[15-16]. 而且, 根据诱发电位幅值和潜伏期的变化, 可以定量分析神经元兴奋性和突触传递等功能的变化特性. 这种方法已广泛用于神经元兴奋机制的研究和神经系统药物作用机制的评价^[17-18].

因此, 为了揭示深度麻醉对于神经元的损伤机理, 本文利用微电极阵列记录技术和电刺激诱发电位的分析方法, 研究乌拉坦麻醉逐渐加深的过程

* 国家重点基础研究发展规划资助项目(2011CB504400), 国家自然科学基金资助项目(30970753).

** 通讯联系人.

Tel: 13515711296, E-mail: fengzhouyan@139.com

收稿日期: 2013-04-11, 接受日期: 2013-06-19

中,大鼠海马 CA1 区神经元最终丧失兴奋性及传导功能的动态变化特性. 鉴于海马对于学习记忆、空间定位和认知等都具有重要的作用^[19-20], 本文的研究结果不仅有助于揭示深度麻醉损害神经系统的机制, 了解神经系统在极端状态下自我保护的生理机能, 而且能够为防止麻醉造成病人记忆和认知功能的损伤、为增强临床麻醉技术的安全应用提供重要的理论依据.

1 方 法

1.1 动物手术和电极植入

成年 Sprague-Dawley 大鼠(250~300 g, 购于浙江省实验动物中心), 用乌拉坦 1250 mg/kg 腹腔注射麻醉后, 固定于脑立体定位仪上. 切开鼻部皮肤, 在鼻骨上钻 2 个小孔, 用不锈钢螺钉分别将参考电极和接地电极固定在鼻骨上. 然后切开头部皮肤, 并去除部分颅骨和硬脑膜, 插入记录电极和刺激电极. 记录电极采用美国 Neuro-Nexus Technologies 公司生产的 16 通道微电极阵列, 刺

激电极使用美国 FHC 公司生产的双极同心电极.

电极植入位置如图 1a 所示. 记录电极植入到海马 CA1 区的胞体层(AP: -3.5 mm; ML: 2.6 mm; DV: 2.5 mm). 逐渐推进电极, 直至记录到稳定的 CA1 区神经元锋电位为止. 然后, 将 2 根刺激电极分别植入到海马 CA1 区的 Schaffer 侧支(AP: -2.2 mm; ML: 2.0 mm; DV: 2.8 mm) 和海马白质(Alveus)(AP: -4.8 mm; ML: 2.7 mm; DV: 2.3 mm), 分别用于正向(orthodromically, O)和反向(antidromically, A)刺激 CA1 区锥体神经元诱发群峰电位(population spike, PS). 海马 CA1 区的主神经元(即锥体神经元)排列紧密, 从上至下清晰地分成基树突层、胞体层和顶树突层等结构; 正向和反向电刺激在不同结构层次上可以诱发出独特的突触电位和动作电位波形. 因此, 根据垂直方向上等间距排列的 16 通道微电极阵列记录的电刺激诱发波形的变化, 就可以将各个电极微调至正确的位置^[21].

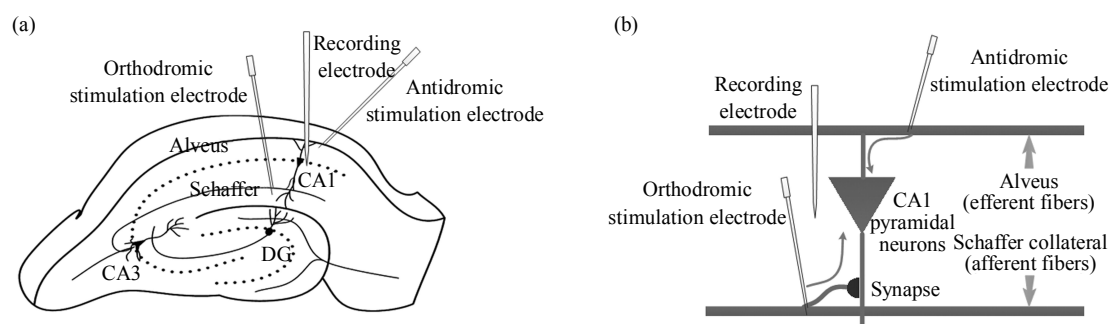


Fig. 1 Experimental diagram of rat hippocampal CA1 region

(a) Implanted positions of the recording and stimulation electrodes. (b) Pathways of orthodromic stimulation and antidromic stimulation.

1.2 记录与刺激

微电极阵列记录的神经电信号通过 3600 型 16 通道放大器(A-M Systems Inc.)放大 100 倍, 频率范围设为 0.3 Hz~5 kHz; 再用 PowerLab 采集系统(ADInstruments Inc.)以 20 kHz 的采样频率进行采样, 模-数转换分辨率为 16 位. 将记录数据存入硬盘, 用于离线分析.

刺激信号是脉宽为 0.1 ms 的方波脉冲, 由 PowerLab 系统发生触发信号, 再控制 2300 型刺激隔离器(A-M Systems Inc.)产生恒流刺激脉冲. 刺激强度设为 0.3~0.6 mA, 使 PS 幅值达到最大可诱

发幅值的 80%以上.

1.3 神经元活动的评价指标

PS 波是大量神经元同时兴奋所产生的动作电位的叠加, 其幅值大小与所兴奋的神经元数目成正比; 相同刺激强度下诱发的 PS 幅值的大小反映了神经元兴奋性的高低^[22]. PS 潜伏期则反映了刺激信号从刺激点传导至神经元胞体部位, 并使其产生动作电位所需的时间^[17], 它与刺激和记录位点之间的距离以及轴突传导和突触传递的速度等因素相关.

本文分别在 CA1 区的 Schaffer 侧支上施加正

向刺激、在 Alveus 上施加反向刺激诱发群峰电位(以下分别简称为 OPS 和 APS), 利用它们的幅值和潜伏期来评价乌拉坦麻醉作用下神经元兴奋性以及轴突和突触传导功能的变化。其中, APS 的幅值定义为负峰与负峰前的正峰之间的幅值之差, OPS 的幅值定义为负峰与其前后两个正峰之差的平均值; 而 APS 和 OPS 的潜伏期都定义为刺激点与 PS 负峰之间的时间差^[2]。APS 的潜伏期要比 OPS 短, 它反映的是刺激兴奋波从 CA1 锥体神经元的轴突直接反向传导至胞体的时间, 而诱发 OPS 时, 刺激传播路径上除了 Schaffer 侧支的轴突传导之外, 还增加了 CA1 锥体神经元树突上的突触传递(图 1), 因此 OPS 的潜伏期较长。

在乌拉坦麻醉剂量逐步递增的过程中, 每隔 30 s 交替诱发 APS 和 OPS 各一次, 计算它们的幅值和潜伏期。统计数据都表示为 $\bar{x} \pm s$, 利用 t 检验或者单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Dunnett- t 检验来比较各组数据之间差别的显著性。

1.4 麻醉深度的递增控制

术前注射乌拉坦 1250 mg/kg, 完成电极植入后保持 3~4 h 神经电信号(包括诱发电位和自发电位)的稳定记录。深度麻醉实验在此基础上进行, 用小剂量多次注射的方式来模拟连续注射, 逐渐增加麻醉深度, 直至大鼠死亡为止。实施时, 在大鼠腹腔内插入留置针, 并将第一次通过留置针注射乌拉坦的时间设为 0 时刻(即 $t=0$)。

每次注射剂量固定为 50 mg, 分设 3 档注射速率 $R=20$ 、40 和 100 mg/(kg·min)。给定大鼠体重 W 和注射速率 R 后, 每 2 次注射之间的时间间隔 T 可以计算如下:

$$T = \frac{\text{单次注射剂量}}{\text{大鼠体重} \times \text{注射速率}} = \frac{50 \text{ mg}}{W \cdot R} \quad (1)$$

大鼠体内乌拉坦的血药浓度估计如下:

假设注射的乌拉坦全部入血, 并且忽略入血所需的吸收时间, 又已知大鼠单位体重的含血量约为 800 ml/kg^[23], 那么, 每次注射产生的血药浓度增量=单位体重注射剂量/(800 ml·kg⁻¹)。

已有实验证明, 当乌拉坦注射剂量大于 400 mg/kg 时其代谢速率处于饱和状态, 恒定为 0.00145 mg/(ml·min)^[23-24]。本文实验过程中乌拉坦的剂量始终远大于 400 mg/kg, 因此, 可以用该代谢速率估计大鼠清除乌拉坦的数量。

由质量守恒定律可知, t 时刻的血药浓度 ρ 等于注射累积产生的总血药浓度减去代谢的血药浓

度。设 t 时刻之前已注射 n 次, 各次的单位体重注射剂量为 $D_i (i=1, 2, \dots, n)$, $t=0$ 之前的麻醉时间为 T_0 ; 则 ρ 的计算公式如下:

$$\rho = \left(\frac{\sum_{i=1}^n D_i}{800} - 0.00145(T_0 + t) \right) \quad (2)$$

本文将 ρ 作为麻醉深度的参考依据。

生理盐水对照组 ($R=0$) 的注射体积设为 0.16 ml/(kg·min), 其单位时间的注射体积与乌拉坦注射速率 $R=40$ mg/(kg·min) 时一致。对照组实验持续 2 h, 并按照与实验组相同的时间间隔记录诱发的 APS 与 OPS。

2 结 果

2.1 神经元轴突传导和胞体兴奋性随麻醉深度加深的变化

海马 CA1 区诱发 APS 的路径不涉及突触传递(图 1b), 因此通过分析 APS 幅值和潜伏期的变化可以研究轴突的传导和胞体兴奋性随麻醉加深的变化。

以 $R=40$ mg/(kg·min) 注射乌拉坦直至大鼠死亡的实验示例如图 2 所示。在整个约 70 min 的麻醉加深过程中, APS 潜伏期(L_{APS})和幅值(A_{APS})在前期近 65 min 的时间内一直缓慢变化, 死亡前不到 5 min 却突然转变为快速变化, APS 的潜伏期几乎直线上升, 而其幅值则迅速减小至 0, 不再诱发出

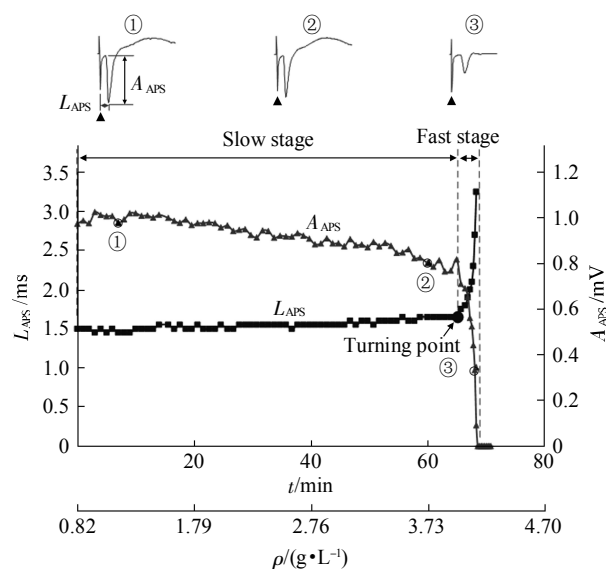


Fig. 2 Changes of APS latency and amplitude as the depth of anesthesia increasing

APS was evoked per minute with a stimulation intensity of 0.4 mA. Example waveforms of APS at the locations denoted by circles on the A_{APS} curve are shown on the top of the plot and are indicated by ①, ② and ③. Arrows below the waveforms indicate the stimulation artifacts. $R=40$ mg/(kg·min).

APS, 大鼠迅速脑死亡. 其间存在明显的突变点. 以该点为界, 可以将整个过程分为慢变期(slow stage)和快变期(fast stage).

由表 1 可见, R 为 $40 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 和 $100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 时, 慢变期的平均持续时间都大于 30 min , 而快变期却不到 5 min . 但在短暂的快变期内 APS 幅值的百分比减小量 $\Delta A_{\text{APS}\%}$ 接近 80%

($\Delta A_{\text{APS}\%}$ 为 APS 幅值的变化量与 $t=0$ 时刻 APS 初始幅值的百分比). 同时, 快变期 APS 潜伏期的增长量 ΔL_{APS} 也显著大于慢变期, 约为慢变期的 5 倍以上. 该结果表明, 在乌拉坦的作用下, 海马 CA1 区神经元轴突传导和胞体兴奋性的衰减都存在突变现象.

Table 1 Comparing the changes of APS latencies and amplitudes between slow stage and fast stage

$R/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	Number of experiments	Stage type	Duration/min ^{ab}	$\Delta L_{\text{APS}}/\text{ms}^{\text{ab}}$	$\Delta A_{\text{APS}\%}/\%^{\text{ab}}$
0 (control)	8		120.00 ± 0.00	$0.00 \pm 0.02^{\#}$	$-0.1 \pm 2.8^{\#}$
40	7	Slow stage	59.90 ± 33.11	$0.26 \pm 0.02^*$	$-29.4 \pm 12.2^*$
		Fast stage	4.46 ± 0.91	1.57 ± 0.41	-79.5 ± 12.5
100	8	Slow stage	33.26 ± 18.90	$0.20 \pm 0.05^*$	$-17.2 \pm 7.9^*$
		Fast stage	3.91 ± 1.01	1.33 ± 0.83	-78.5 ± 16.7

^a Control and slow stage group: one-way ANOVA, $F > 19.8$, $P < 0.001$. ^b Control and fast stage group: one-way ANOVA, $F > 20.1$, $P < 0.001$.

^{*} Control *vs.* slow stage: Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.01$. [#] Control *vs.* fast stage: Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.01$. ^{*} Slow stage *vs.* fast stage: Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.01$.

根据 APS 的诱发路径(图 1b), CA1 锥体神经元轴突和胞体兴奋性的改变都可能引起 APS 的变化. 下面我们利用深度麻醉实验开始之前基线记录的输入-输出(input-output, I/O)曲线作为对照, 来分析慢变期和快变期 APS 幅值的减小和潜伏期的增长究竟起因于轴突还是胞体.

I/O 曲线如图 3a 所示, 当刺激强度从 0.1 mA 递增至 0.5 mA 时, APS 的幅值增加量 $\Delta A_{\text{APS}\%} = (55.6 \pm 21.3)\%(n=12)$, 相对于刺激强度为 0.5 mA 时诱发的最大 APS 幅值的百分比; 而相应的 APS 潜伏期减小量只有 $\Delta L_{\text{APS}} = (0.10 \pm 0.08) \text{ ms}(n=12)$. 可见, 在正常情况下, 即使神经元兴奋的数量(即 APS 幅值)变化很大, 轴突的传导速度仍然保持恒定. 但是, 在深度麻醉下变化量较小的慢变期, ΔL_{APS} 也已经显著大于 I/O 曲线的 ΔL_{APS} (图 3b, Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.01$, $n=7$). 因此, 在深度麻醉慢变期和快变期 APS 潜伏期的显著增加(表 1)很可能是轴突传导受阻引起的, 而 APS 幅值的减小则可能由神经元兴奋性下降和轴突传导受阻双重因素引起.

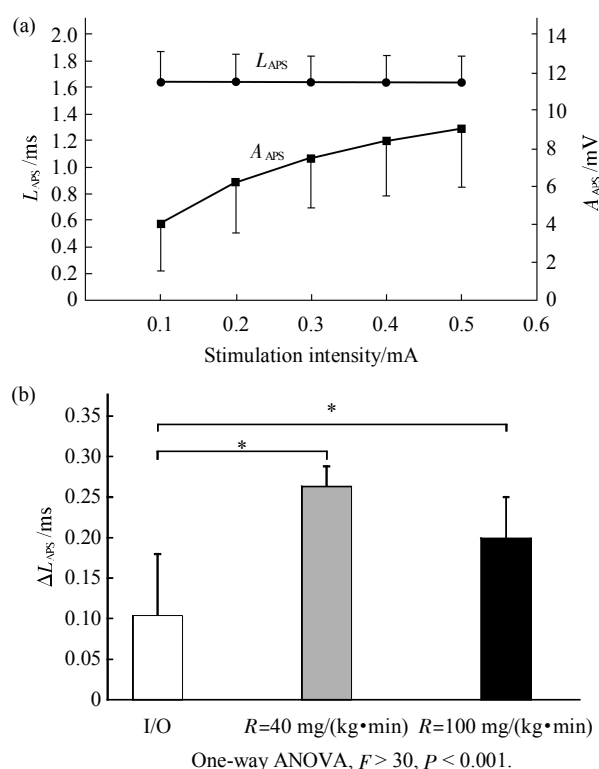


Fig. 3 Comparison of the APS changes among the baseline I/O curve and the slow stage of deep anesthesia

(a) Baseline I/O curves of APS latency and amplitude. (b) Changes of APS latency of I/O curves and during the slow stages ($R = 40$ and $100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$). * Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.03$, $n=7$.

2.2 突触传导随麻醉加深的变化

如图 1b 所示, 在海马 CA1 区正向刺激诱发 OPS 时, 需要经过 Schaffer 侧支的轴突和锥体神经元顶树突上的突触传递, 才能够兴奋突触后的锥体神经元. 因此, OPS 潜伏期和幅值的变化包含了神经元突触传递功能的变化.

表 2 所示是乌拉坦 3 种不同注射速率(R)下 OPS 潜伏期和幅值的变化. 如图 4 所示, 在麻醉不断加深的过程中, OPS 的潜伏期 L_{OPS} 逐渐增长, 幅值 A_{OPS} 逐渐减小, 直至最终 OPS 完全丧失. 而且由图 5 可见, OPS 丧失的时间几乎与 APS 慢变期的结束时间一致. 由于 OPS 的诱发路径比 APS 的诱发路径多了突触传递, OPS 潜伏期是轴突传导和突触传递延时之和, 如果从中减去轴突传导的延时, 就可以获得突触传递的延时. 由于正向和反向刺激电极与记录电极之间的距离都约为 1.3 mm, 两种刺激在轴突上的传导时间近似相等, 因此将 L_{OPS} 减去同时测量的 L_{APS} , 剩余值(用 L_{syn} 表示)可以反映 OPS 的突触传递延时(见图 5 的 L_{OPS} 、 L_{syn} 和 L_{APS} 示例). 以 $R=40\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 为例, 由表 1 和表 2 可知, 增长量 ΔL_{APS} (慢变期)和 ΔL_{OPS} 分别为 $(0.26 \pm 0.02)\text{ ms}$ 和 $(1.38 \pm 0.21)\text{ ms}$, 求得 ΔL_{syn} 为 $(0.71 \pm 0.40)\text{ ms}$, 此 ΔL_{syn} 显著大于同期的 ΔL_{APS} (图 5b, Paired t -test, $P < 0.05$, $n=7$). 而且同期 OPS 幅值减小量的百分比值($\Delta A_{OPS\%}=(-58.5 \pm 16.7)\%$)

也显著超过 APS 的值($\Delta A_{APS\%}=(-29.4 \pm 12.2)\%$)(表 1 和表 2, Paired t -test, $P < 0.05$, $n=7$). 由此可见, 与轴突传导相比, 突触传递对乌拉坦的作用更加敏感, 麻醉加深会导致突触传递能力下降得更快.

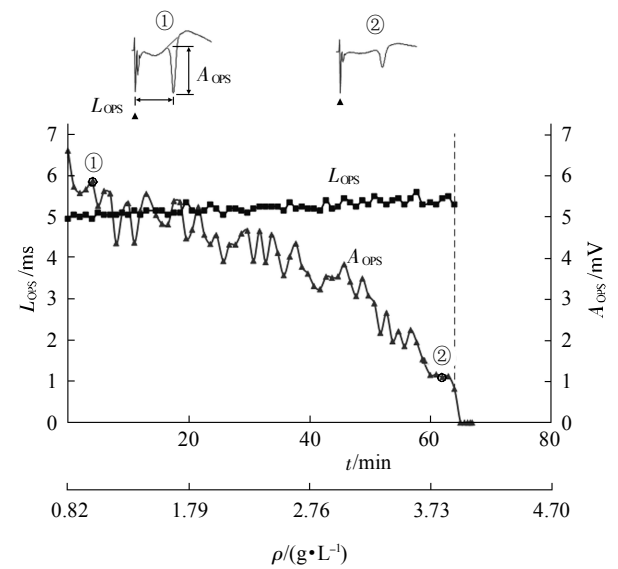


Fig. 4 Changes of OPS latencies and amplitudes during the period of deep anesthesia till brain death
The intensity of orthodromic stimulation is 0.4 mA. Example waveforms of OPS at the locations denoted by circles on the A_{OPS} curve are shown on the top of the plot and are indicated by ① and ②. Arrows below the OPS waveforms indicate the stimulus artifacts. $R=40\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{min})$.

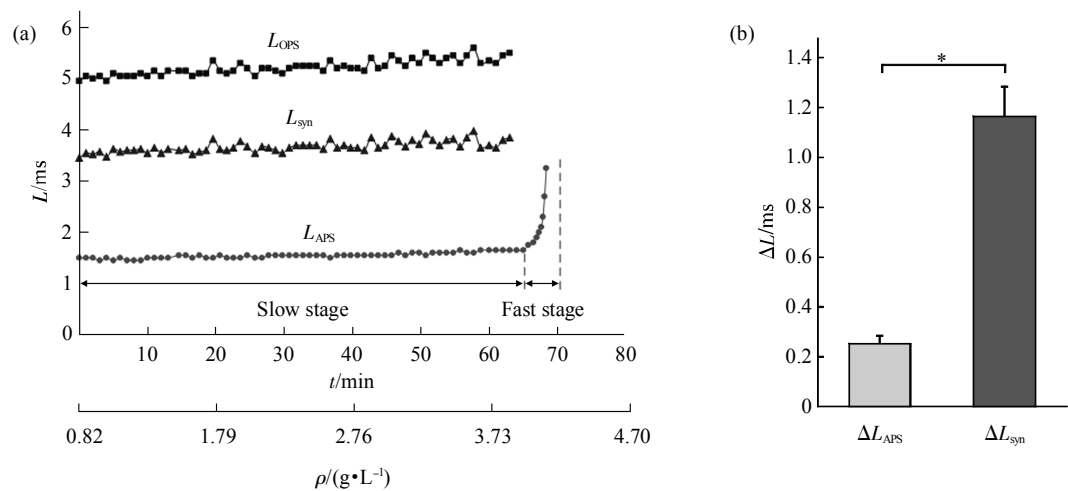


Fig. 5 Changes of synaptic transmission latencies during the period of deep anesthesia
(a) Example of the changes of L_{APS} , L_{OPS} and L_{syn} . (b) Comparison between ΔL_{APS} and ΔL_{syn} . * Paired t -test, $P < 0.001$, $n=6$. $R=40\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{min})$.

Table 2 Changes of OPS latencies and amplitudes with different urethane injection rates

$R/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	Number of trails	Duration/min ^a	Final $\rho/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$\Delta L_{\text{OPS}}/\text{ms}^a$	$\Delta A_{\text{OPS}}/\%$ ^a
0 (control)	6	120	0	$0.10 \pm 0.08^{\#}$	$2.1 \pm 6.3^{\#}$
20	5	$120 \pm 44.1^{**}$	3.96 ± 0.36	1.68 ± 0.45	$-74.4 \pm 11.8^{\wedge}$
40	7	57.0 ± 28.5	3.62 ± 1.22	1.39 ± 0.20	-58.5 ± 16.7
100	7	32.6 ± 18.9	4.45 ± 1.35	0.91 ± 0.48	-43.2 ± 17.2

^a One-way ANOVA, $F > 12.4$, $P < 0.001$. [#] Control *vs.* orthos, Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.02$. ^{*} $R=20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ *vs.*

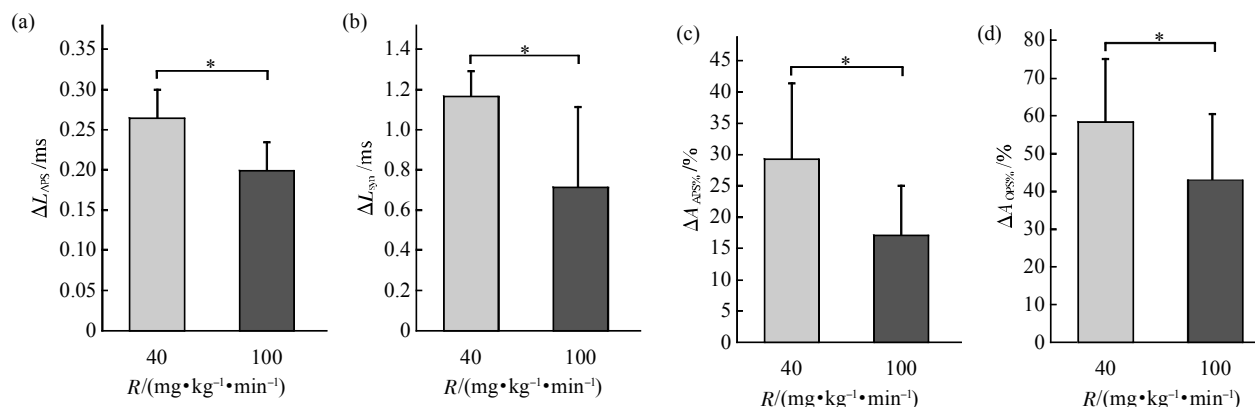
$R=40 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$, Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.05$. [^] $R=20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ *vs.* $R=100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$, Dunnett-*t* post hoc test, $P < 0.05$.

2.3 注射速率对于神经元功能变化的影响

可以预料注射速率 R 越大, 大鼠体内血药浓度增加的速度越快, PS 丧失得也越快. 以 OPS 为例, 在不同 R 下 OPS 的保持时间(即表 2 的“Duration”)确实存在显著差别(ANOVA, $F > 12.4$, $P < 0.001$); R 为 20、40 和 100 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 时, 其值从 $(120 \pm 44.1) \text{ min}$ 、 $(57.0 \pm 28.5) \text{ min}$ 下降到 $(32.6 \pm 18.9) \text{ min}$. 而 3 种 R 下 OPS 丧失时乌拉坦的血药浓度 ρ 却没有显著差别(表 2, ANOVA, $F < 0.71$, $P > 0.51$). 由此可见, 引起 OPS 丧失的

决定性因素不是麻醉时间的长短, 而可能是血药浓度.

那么, 麻醉深度长时间缓慢递增与短时间快速递增相比较, 临近突变时的神经元受损程度是否有差别呢? 如图 6 所示, 比较 R 为 40 和 100 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 下 APS 突变时或者 OPS 丧失前的 ΔL_{APS} 、 ΔL_{syn} 、 ΔA_{APS} 和 ΔA_{OPS} . 可见这 4 个指标在两种 R 下都存在显著差别, 并且 R 较小时突变时神经元兴奋性以及轴突传导和突触传递功能的受损更严重.

**Fig. 6** Differences of PS latencies and amplitudes between two injection rates

Changes of APS latencies (a) and amplitudes (b) at the turning point. Changes of synaptic transmission delays (c) and OPS amplitudes (d) before OPS loss. * *t*-test, $P < 0.05$.

3 讨 论

本文通过分析大鼠海马 CA1 区正向和反向刺激诱发 PS 的幅值和潜伏期, 研究了乌拉坦深度麻醉至死亡期间神经元兴奋性和传导功能衰减的动态

变化过程. 主要发现有: a. 神经元功能的衰减存在由慢变到快变的突变现象, 而且与轴突传导相比较, 突触传递对于乌拉坦的作用更加敏感. b. 引起突变的决定性因素可能是乌拉坦的血药浓度, 而非麻醉时间的长短. c. 注射速率较慢时, 突变前

神经元兴奋性和传导功能的受损更严重. 其中的可能机制分析如下.

乌拉坦由于麻醉效果稳定, 被广泛应用于各类动物手术^[5, 25-26]. 已有的研究成果表明, 乌拉坦对电压门控离子通道和化学递质离子通道都有抑制或促进作用, 并且其作用是非特异性的^[5, 27-28]. 它既可以通过调节 K^+ 通道电流改变突触前膜化学递质的发放^[29], 也可以改变兴奋性突触后膜上的 NMDA 和 AMPA 等受体的离子通道的功能^[27]. 而且乌拉坦对 NMDA 和 AMPA 的半数有效浓度分别为 70 mmol/L(6.23 g/L)和 34 mmol/L(3.03 g/L), 大于 Na^+ 通道的 23 mmol/L(2.05 g/L)^[27-28]. 这些报道都支持本文的研究结果: 乌拉坦对于海马神经元胞体的兴奋性以及轴突传导和突触传递都具有抑制作用. 而且, 麻醉过程中 OPS 幅值的变化量远大于 APS 幅值的变化量, 即突触传递受损大于轴突传导, 原因可能就是乌拉坦对于兴奋性突触后膜离子通道作用较大.

尚未见报道的是, 本文的在体研究新发现了乌拉坦持续衰减神经元功能的过程中存在突变现象. 这一现象既反映了麻醉中存在的生理耐受极限, 又体现了神经系统的补偿作用.

本文的研究结果显示, 当乌拉坦血药浓度达到一定的极限值(4 g/L 左右)时会导致神经元功能的丧失. 而且, 即使最终的血药浓度相当, R 较小时突变时神经元功能的受损程度却高于 R 较大时的情况. 这一发现说明神经元功能的突变和丧失并不完全取决于其功能衰减的程度. 较小的 R 使得神经系统可能有更多的时间调动其他补偿机制来维持生命, 从而延缓突变的发生. 另一方面也说明即使血药浓度没有达到致命的极限值, 长时间的较低浓度药物的作用对于神经元功能的损伤也会大于短时间的较高浓度药物作用. 因此在实际应用中, 在控制麻醉药剂量的同时也要尽可能缩短麻醉时间.

另外, 本文所采用的电生理学方法具有时间分辨率高的特点, 它能够体现神经元功能衰变的动态过程, 这是形态学方法难以实现的. 不过, 本文仅以大鼠实验中常用的麻醉剂乌拉坦为例, 研究了深度麻醉至脑死亡期间的神经元活动的突变现象. 这种现象是否具有普遍性, 还有待进一步研究.

4 结 论

本文的研究结果表明, 在乌拉坦麻醉深度持续增加的过程中海马区神经元功能的衰减存在突变,

突变前长时间缓慢而稳定的变化可能是麻醉剂与生理补偿的自我保护机制共同作用的结果. 血药浓度的极限值是导致神经元功能丧失的重要因素, 但是长时间较低浓度的药物作用虽不能使神经元功能快速衰减, 但也会持续损伤神经元功能. 这些结论有助于提高临床麻醉药物使用的安全性以及动物实验的可靠性, 为麻醉技术的安全应用提供理论依据.

参 考 文 献

- [1] Kaul H, Bharti N. Monitoring depth of anaesthesia. *Indian J Anaesth*, 2002, **46**(4): 323-332
- [2] Franks N P, Lieb W R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*, 1994, **367**(7): 607-614
- [3] 庄心良, 曾因明. 现代麻醉学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 396-397
Zhuang X L, Zeng Y M. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 396-397
- [4] 阮静, 皋源, 杭燕南. 全麻后中枢神经系统并发症. *中国医药导刊*, 2007, **9**(5): 387-390
Ruan J, Gao Y, Hang Y N. *Chin J Med Guide*, 2007, **9**(5): 387-390
- [5] 杨黎黎, 李树清. 乌拉坦麻醉动物的病理生理学作用. *微循环学杂志*, 2011, **21**(1): 59-61
Yang L L, Li S Q. *Chin J Microcirculation*, 2011, **21**(1): 59-61
- [6] Mercer L, Remley N, Gilman D. Effects of urethane on hippocampal unit activity in the rat. *Brain Research Bulletin*, 1978, **3**(5): 567-570
- [7] Sceniak M P, MacIver M B. Cellular actions of urethane on rat visual cortical neurons *in vitro*. *Journal of Neurophysiology*, 2006, **95**(6): 3865-3874
- [8] Potez S, Larkum M E. Effect of common anesthetics on dendritic properties in layer 5 neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 2008, **99**(3): 1394-1407
- [9] Bennett M C, Diamond D M, Fleshner M, *et al.* Serum corticosterone level predicts the magnitude of hippocampal primed burst potentiation and depression in urethane-anesthetized rats. *Psychobiology*, 1991, **19**(4): 301-307
- [10] Engstrom D A, Catherine Bennett M, Stevens K E, *et al.* Modulation of hippocampal primed burst potentiation by anesthesia. *Brain Research*, 1990, **521**(1): 148-152
- [11] Shirasaka Y, Wasterlain C G. The effect of urethane anesthesia on evoked potentials in dentate gyrus. *European Journal of Pharmacology*, 1995, **282**(1): 11-17
- [12] Riedel G, Seidenbecher T, Reymann K G. LTP in hippocampal CA1 of urethane-narcotized rats requires stronger tetanization parameters. *Physiology & Behavior*, 1994, **55**(6): 1141-1146
- [13] Erchova I A, Lebedev M A, Diamond M E. Somatosensory cortical neuronal population activity across states of anaesthesia. *European Journal of Neuroscience*, 2002, **15**(4): 744-752
- [14] 封洲燕, 郑筱祥. 不同麻醉深度下大鼠脑电复杂度和功率谱的变化过程. *中国生物医学工程学报*, 2004, **23**(1): 87-91, 86
Feng Z Y, Zheng X X. *Chin J Biomedical Engineering*, 2004, **23**(1):

- 87–91, 86
- [15] Freund T, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 1996, **6**(4): 347–470
- [16] Andersen P, Bliss T, Skrede K K. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Experimental Brain Research*, 1971, **13**(2): 222–238
- [17] Kloosterman F, Peloquin P, Leung L S. Apical and basal orthodromic population spikes in hippocampal CA1 *in vivo* show different origins and patterns of propagation. *Journal of Neurophysiology*, 2001, **86**(5): 2435–2444
- [18] Wu K, Leung L. Increased dendritic excitability in hippocampal CA1 *in vivo* in the kainic acid model of temporal lobe epilepsy: a study using current source density analysis. *Neuroscience*, 2003, **116**(2): 599–616
- [19] Schacter D L, Slotnick S D. The cognitive neuroscience of memory distortion. *Neuron*, 2004, **44**(1): 149–160
- [20] Langston R F, Ainge J A, Couey J J, *et al.* Development of the spatial representation system in the rat. *Science*, 2010, **328**(5985): 1576–1580
- [21] 封洲燕, 光磊, 郑晓静, 等. 应用线性硅电极阵列检测海马场电位和单细胞动作电位. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(4): 401–407
- Feng Z Y, Guang L, Zheng X J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(4): 401–407
- [22] Theoret Y, Brown A, Fleming S, *et al.* Hippocampal field potential: a microcomputer aided comparison of amplitude and integral. *Brain Research Bulletin*, 1984, **12**(5): 589–595
- [23] O'Flaherty E, Sichak S. The kinetics of urethane elimination in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1983, **68**(3): 354–358
- [24] Kaye A. A study of the relationship between the rate of ethyl carbamate (urethan) catabolism and urethan carcinogenesis. *Cancer Research*, 1960, **20**(2): 237–241
- [25] 周昆, 屈彩芹. 动物实验常用麻醉剂的比较与选择. *实验动物科学*, 2008, **25**(2): 41–43
- Zhou K, Qu C Q. *Laboratory Animal Science*, 2008, **25**(2): 41–43
- [26] Koblin D D. Urethane: help or hindrance?. *Anesthesia & Analgesia*, 2002, **94**(2): 241–242
- [27] Hara K, Harris R A. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthesia & Analgesia*, 2002, **94**(2): 313–318
- [28] 雷霆, 田裕涛, 杨卓, 等. 乌拉坦对大鼠海马 CA1 神经元电压门控钠通道和动作电位的作用. *生物物理学报*, 2008, **24**(2): 117–122
- Lei T, Tian Y T, Yang Z, *et al.* *Acta Biophys Sin*, 2008, **24**(2): 117–122
- [29] Tian Y, Lei T, Yang Z, *et al.* Urethane suppresses hippocampal CA1 neuron excitability *via* changes in presynaptic glutamate release and in potassium channel activity. *Brain Research Bulletin*, 2012, **87**(4–5): 420–426

Catastrophe of Neuronal Activity in Rat Hippocampus During The Period of Deep Anesthesia Till Brain Death*

CAO Jia-Yue, FENG Zhou-Yan**, ZHENG Xiao-Jing, CHEN Bai-Lu

(College of Biomedical Engineering and Instrumentation Science, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Improper usage of general anesthesia may cause fatal damage to the central nervous system. Therefore, its safety becomes a major concern. In order to reveal the changing patterns of neuronal activity during the period of increasing anesthetic depth, the present paper investigated the changes of excitability and signal conduction of neurons in the rat hippocampus during deep anesthesia till brain death with urethane. By using the techniques of microelectrode array recording and electrical stimulation, we recorded population spikes (PS) in the pyramidal layer of hippocampal CA1 region that were evoked either by orthodromic stimulation of the Schaffer collateral or by antidromic stimulation of the alveus. The amplitude and latency of PS were used as indices to evaluate the changes of neuronal activity. The results showed that as the urethane concentration in the plasma increased, the amplitudes of PS decreased and the latencies of PS increased, indicating that the urethane suppressed the neuronal excitability as well as the synaptic transmission and axon conduction. Particularly, there was a turning point that divided the whole decline period of neuronal activity into two distinct stages: slow stage and fast stage. The catastrophic decline of fast stage resulted in brain death rapidly. In addition, the urethane concentration in plasma, rather than the duration of anesthesia, might cause the appearance of turning point. However, the prolonged duration of slow stage caused by slower injection rate of urethane could also induce more damage to neuronal functions. These results provide important information for the safe application of narcotics in both animal experiments and clinic usage.

Key words anesthesia, urethane, hippocampus, neuron, catastrophe

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00144

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2011CB504400) and The National Natural Science Foundation of China (30970753).

**Corresponding author.

Tel: 86-13515711296, E-mail: fengzhouyan@139.com

Received: April 11, 2013 Accepted: June 19, 2013