

罗哌卡因对新生大鼠脑细胞凋亡以及学习能力的影响

李前辉, 谢小娟, 张宜林

摘要 目的 探讨罗哌卡因对新生大鼠脑细胞凋亡以及学习能力的影响。方法 60只出生10d的新生大鼠随机分为对照组、低剂量组和高剂量组3组,每组20只,低剂量组和高剂量组采用微量注射器经腹腔分别给予0.5%的罗哌卡因20 μ l和60 μ l,对照组注射生理盐水60 μ l。3组大鼠在给药后12h处死,分离血清采用ELISA测定血清炎症因子(TNF- α 、IL-1 β);分离脑组织,采用荧光定量PCR和Western blot分析炎症因子和凋亡相关蛋白的表达水平,采用TUNEL染色分析脑组织细胞凋亡情况。另取60只出生10d的新生大鼠随机分为对照组、低剂量组和高剂量组,每组20只,如上处理后29d,采用Morris水平迷宫实验分析大鼠学习记忆能力。结果 与对照组比较,低剂量组和高剂量组大鼠脑组织和血清炎症因子TNF- α 和IL-1 β mRNA和蛋白质水平显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,低剂量组和高剂量组Bax和Caspase-3水平明显增加,Bcl-2水平显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,低剂量组和高剂量组脑组织细胞凋亡水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与低剂量组比较,高剂量组脑组织细胞凋亡水平增加更为显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,在第29~32天,低剂量组和高剂量组大鼠逃避潜伏期明显延长,其中第31天和第32天,高剂量组逃避潜伏期高于低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 罗哌卡因可引起新生大鼠脑组织出现炎症并伴有细胞凋亡,进而影响大鼠的学习记忆能力。

关键词 罗哌卡因; 炎症; 凋亡; 学习能力

中图分类号 R 971.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1710-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.013

我国每年有大量的婴幼儿会接受麻醉及手术,麻醉及手术创伤对婴幼儿的影响一直是医院和家长关注的问题。诸多的临床研究以及实验动物研究显示患者在术后及麻醉后出现认知性的障碍均与麻醉

药物存在相关性^[1-2]。麻醉药物是目前公认的能引起患者出现短时间认知障碍的药物^[3]。罗哌卡因是临床常用的局部麻醉药物之一,被广泛应用于各种麻醉,特别是剖宫产和婴幼儿小手术中^[4-6]。罗哌卡因作为一种局部麻醉药物,是否会对婴幼儿认知造成影响,目前报道较少。该研究以新生大鼠作为研究对象,分析了罗哌卡因对新生大鼠学习认知能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 120只出生10d的新生大鼠购自上海斯莱克生物有限公司,动物批准号:12910371116,大鼠饲养于SPF动物房。

1.2 实验材料 TNF- α 和IL-1 β 细胞因子试剂盒购自美国R&D公司;RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒购自南京诺唯赞生物有限公司;2 $\times$ AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物有限公司;Bcl-2、Bax和Caspase-3单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;HRP标记的羊抗鼠二抗购自北京中山金桥生物有限公司;TUNEL染色试剂盒购自南京诺唯赞生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 实验分组与处理 60只出生10d的新生大鼠随机分为3组,每组20只,即对照组、低剂量组和高剂量组。低剂量组和高剂量组分别采用微量注射器经腹腔给予0.5%的罗哌卡因20 μ l和60 μ l,对照组注射60 μ l的生理盐水。在处理12h后,60只新生大鼠全部处死,取血液和脑组织,进行后续指标检测。另取60只出生10d的新生大鼠如上处理后29d,采用水平迷宫实验分析学习记忆能力。

1.4 荧光定量PCR分析炎症因子mRNA水平 取脑组织0.1g,匀浆后采用RNA提取试剂盒提取总RNA,并采用逆转录试剂盒逆转录为cDNA,作为PCR模板。然后根据根据PSAT1基因的序列,设计如下引物:PSAT1: (F: 5'-GGCCAGTTCAGTGCT-GTCC-3'; R: 5'-GCTCCTGTCACCACATAGTCA-3')、GAPDH: (F: 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3'; R: 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3')。制备RT-

2020-06-08 接收

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划项目(编号: 2015B20235)

作者单位: 河南科技大学第一附属医院麻醉科 洛阳 471023

作者简介: 李前辉,女,副主任医师,责任作者, E-mail: yangshao-hua123789@163.com

PCR 体系: $2 \times \text{qPCR SYBR Green Mix}$ $10 \mu\text{l}$, 上游和下游引物各 $1 \mu\text{l}$, μDNA 模板 $1 \mu\text{l}$, 用水将体积补至 $20 \mu\text{l}$ 。按照以下反应条件进行 PCR: 93°C , 3 min 预变性; 93°C , 30 s 变性; 55°C , 45 s 退火延伸; 72°C 延伸 45 s , 共 40 个循环。最后从实时荧光定量 PCR 仪上直接读取数据, 进行定量分析。

1.5 ELISA 法检测血清炎症因子的水平 新生大鼠在处理 12 h 后, 取血液, 在 4°C 静置 12 h, 使血清分层, 然后 $3\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min , 收集血清。然后按照 ELISA 试剂盒操作说明书测定 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的水平。

1.6 Western blot 分析脑组织凋亡相关蛋白的表达 取脑组织 0.5 g , 加入细胞裂解液, 匀浆后, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 20 min , 然后将上清转移至新的离心管, $20\,000 \text{ g}$ 离心 1 h , 收集细胞裂解上清, 加入 $5 \times \text{Loading buffer}$ 在金属浴中煮沸 20 min , 然后进行 SDS-PAGE, 起始电压 80 V 。待溴酚蓝进入分离胶, 将电压调至 120 V 。电泳结束后将蛋白转移至 NC 膜上, NC 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 30 min , 结束后分别用 5% 脱脂奶粉稀释 Bcl-2、Bax、Caspase-3 单克隆抗体, 在 4°C 孵育 12 h , 结束后用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min ; 再用 5% 脱脂奶粉稀释 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 在室温孵育 30 min , 然后 PBST 洗涤 3 次后, NC 膜上滴加发光液后进行扫描, 分析蛋白条带变化, 并以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参。

1.7 TUNEL 检测脑组织细胞凋亡水平 将各组大鼠脑组织切成 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 的石蜡切片; 将切片用二甲苯浸洗脱蜡, 共 2 次, 每次 5 min ; 分别用 100%、95%、90%、80%、70% 乙醇浸洗水化, 每次 3 min ; 3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min ; TBS 浸洗 5 min ; 滴加 Proteinase K 溶液(浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$), 室温孵育 15 min ; TBS 浸洗 5 min ; 配制 TUNEL 反应混合物, 滴加 $100 \mu\text{l}$ TUNEL 反应混合物, 置于湿盒中, 37°C 避光孵育 60 min ; TBS 浸洗 2 次, 每次 5 min ; 倒置荧光显微镜下进行观察, 观察时采用 40 倍物镜和 10 倍目镜, 随机选取梗死区和周边区域 10 个视野, 计算凋亡细胞占总细胞的比例作为脑细胞的凋亡指数。

1.8 Morris 水平迷宫实验 水平迷宫实验方法按 Wen et al^[6] 方法进行。主要测定不同处理大鼠平均逃避潜伏期, 原平台象限活动时间和穿越原平台次数。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间计量数量

比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗哌卡因对新生大鼠炎症因子的影响 与对照组比较, 罗哌卡因低剂量组和高剂量组大鼠脑组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ mRNA 及血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 蛋白质水平明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与低剂量组比较, 高剂量组大鼠脑组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ mRNA 及血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 蛋白质水平明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 罗哌卡因对新生大鼠炎症因子水平的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	脑组织 mRNA 水平		血清蛋白质水平(ng/L)	
	$\text{TNF-}\alpha$	$\text{IL-1}\beta$	$\text{TNF-}\alpha$	$\text{IL-1}\beta$
对照	0.91 ± 0.21	1.10 ± 0.25	78.43 ± 7.32	134.33 ± 14.32
低剂量	$1.14 \pm 0.29^*$	$1.32 \pm 0.30^*$	$125.33 \pm 10.43^*$	$187.33 \pm 19.43^*$
高剂量	$1.48 \pm 0.43^{* \#}$	$1.57 \pm 0.33^{* \#}$	$178.32 \pm 15.32^{* \#}$	$238.32 \pm 23.43^{* \#}$
F 值	3.901	3.012	4.091	3.816
P 值	0.007	0.015	0.000	0.010

与对照组比较: $^* P < 0.05$; 与低剂量组比较: $^{\#} P < 0.05$

2.2 罗哌卡因对新生大鼠脑组织凋亡相关蛋白的影响 与对照组比较, 罗哌卡因低剂量组和高剂量组大鼠脑组织中凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 蛋白水平明显增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与低剂量组比较, 高剂量组大鼠脑组织中凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 蛋白水平增加更为显著, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平下降更明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



图 1 罗哌卡因对新生大鼠脑组织凋亡相关蛋白的影响

1: 对照组; 2: 低剂量组; 3: 高剂量组

2.3 罗哌卡因对新生大鼠脑组织凋亡水平影响 与对照组比较, 罗哌卡因低剂量组和高剂量组大鼠脑组织细胞凋亡水平明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与低剂量组比较, 高剂量组大鼠脑组织细胞凋亡水平增加更为显著, 差异有统计学意义

($P < 0.05$)。见图 2。

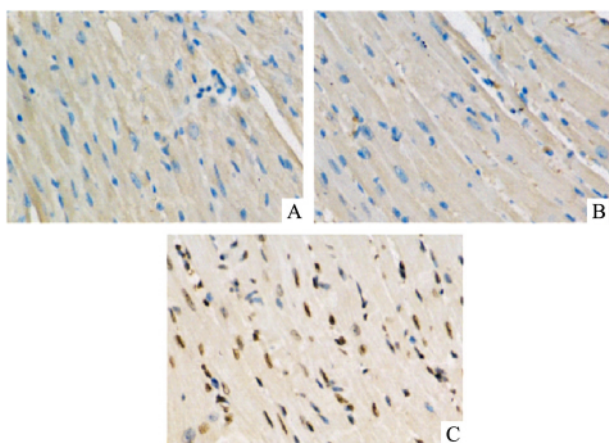


图 2 罗哌卡因对新生大鼠脑组织细胞凋亡水平的影响
A: 对照组; B: 低剂量组; C: 高剂量组

2.4 罗哌卡因对新生大鼠学习记忆能力的影响
与对照组比较,在第 29~32 天,低剂量组和高剂量组大鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$),其中第 31 天和第 32 天,高剂量组逃避潜伏期高于低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组探索实验中原平台象限活动时间和穿越平台次数差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、3。

表 2 罗哌卡因对新生大鼠逃避潜伏期的影响($s, n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别	第 29 天	第 30 天	第 31 天	第 32 天
对照	79.42 ± 8.91	50.39 ± 7.81	34.12 ± 5.89	17.89 ± 5.12
低剂量	89.43 ± 9.32*	78.22 ± 9.71*	48.39 ± 6.54*	30.91 ± 6.29*
高剂量	94.38 ± 10.43*	83.25 ± 10.56*	61.33 ± 7.61*#	40.22 ± 6.89*#
F 值	2.710	2.910	2.518	3.419
P 值	0.020	0.011	0.031	0.006

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与低剂量组比较: # $P < 0.05$

表 3 罗哌卡因对小鼠探索能力的影响($n = 14, \bar{x} \pm s$)

组别	原平台象限活动时间(s)	穿越原平台次数(次)
对照	31.34 ± 6.32	4.51 ± 1.32
低剂量	34.21 ± 6.72	4.15 ± 1.25
高剂量	32.14 ± 7.17	4.01 ± 1.29
F 值	1.109	1.094
P 值	0.417	0.538

3 讨论

罗哌卡因是单一对映结构长效酰胺类局麻药,其作用机制与其它局麻药相似,通过抑制神经细胞钠离子通道,阻断神经兴奋与传导^[7]。罗哌卡因被广泛应用于硬膜外麻醉如剖宫产术或者儿科手术,或者用于术后及分娩镇痛等过程中^[8-9]。但其是否会对分娩时胎儿或者婴幼儿造成一定的不良反应,目前报道很少。认知障碍是麻醉类药物常见的

不良反应。认知是机体认识和获取知识的智能加工过程,它包括学习、记忆、语言、思维、精神、情感等一系列的心理和社会行为^[10-11]。目前对于麻醉药物对认知的影响说法不一,有研究显示麻醉药物可以提高患者的认知能力,有研究显示麻醉药物可降低患者的认知能力。本研究在动物水平上分析了罗哌卡因对大鼠学习认知能力的影响。

为了模拟胎儿或者婴幼儿,本研究选用出生后第 7 天大鼠作为研究模型。出生后第 7 天是啮齿类动物大脑神经细胞发育的高峰时期,是研究药物对神经系统影响的最佳时期^[12]。Morris 水迷宫实验被广泛用于实验动物的学习记忆能力分析^[13]。本研究结果显示,与对照组比较,低剂量组和高剂量组大鼠逃避潜伏期明显延长,其中第 31 天和第 32 天,高剂量组逃避潜伏期高于低剂量组,说明罗哌卡因处理大鼠后会影响到大鼠的学习记忆能力,并随着药物剂量增加,影响水平也逐渐增强。在探索实验中,研究结果显示,罗哌卡因对原平台象限活动时间和穿越平台次数无影响,说明罗哌卡因对大鼠探索能力无影响。

在罗哌卡因处理大鼠后,可见大鼠炎症因子的水平明显增加,说明罗哌卡因可以诱导机体出现炎症反应。同时罗哌卡因导致脑组织细胞凋亡相关蛋白的表达水平上调,细胞凋亡比例明显增加。上述结果说明罗哌卡因可以导致炎症,并诱发细胞凋亡。值得注意的是,罗哌卡因对细胞炎症和凋亡的影响相对较弱,但是对于新生大鼠而言,轻微的炎症或者凋亡可能导致神经元损伤,神经元不具有增殖能力,一旦损伤可能会明显降低信息传递的能力。

综上所述,罗哌卡因对新生大鼠脑组织可产生炎症反应,并诱导细胞凋亡,进而影响大鼠的学习和记忆能力。

参考文献

- [1] Kang E, Jiang D, Ryu Y K, et al. Early postnatal exposure to isoflurane causes cognitive deficits and disrupts development of newborn hippocampal neurons via activation of the mTOR pathway [J]. PLoS Biol, 2017, 15(7): e2001246.
- [2] Hu D, Flick R P, Zaccariello M J, et al. Association between exposure of young children to procedures requiring general anesthesia and learning and behavioral outcomes in a population-based birth cohort [J]. Anesthesiology, 2017, 127(2): 227-40.
- [3] 赖尚导, 钟伟强, 陈伟元, 等. 七氟醚对新生大鼠发育期学习记忆功能的影响及其可能的机制 [J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(9): 829-32.
- [4] 徐光红, 李 侠, 张 健. 甲磺酸罗哌卡因在下腹及会阴部手

- 术后硬膜外镇痛效果[J]. 安徽医科大学学报 2006 41(6): 719–20.
- [5] Li T F, Fan H, Wang Y X. Epidural sustained release ropivacaine prolongs anti-allodynia and anti-hyperalgesia in developing and established neuropathic pain [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (1): e0117321.
- [6] Wen X, Liang H, Li H, et al. In vitro neurotoxicity by ropivacaine is reduced by silencing Cav3.3 T-type calcium subunits in neonatal rat sensory neurons [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017 3: 1–8.
- [7] Vilchis Rentería J S, Zaragoza Lemus M G, González Guzmán M D, et al. Postoperative assessment of cognitive state: a preliminary comparative study of lumbar plexus or epidural analgesia in patients subjected to hip-replacement surgery [J]. *Rev Esp Anestesiología Reanim*, 2012, 59(3): 162–3.
- [8] 钱梅, 方能新, 张健, 等. 罗哌卡因用于经腹胆囊切除术硬膜外麻醉临床效果观察[J]. 安徽医科大学学报 2004 39(5): 388–90.
- [9] Chethanananda T N, Shashank M R, Madhu N, et al. Comparative efficacy of minimal concentration of racemic bupivacaine (0.0625%) with fentanyl and ropivacaine (0.1%) with fentanyl for epidural labor analgesia [J]. *Anesth Essays Res*, 2017, 11(3): 583–8.
- [10] Stratmann G, Sall J W, May L D, et al. Beyond anesthetic properties: the effects of isoflurane on brain cell death, neurogenesis, and long-term neurocognitive function [J]. *Anesth Analg*, 2010, 110(2): 431–7.
- [11] Paule M G, Li M, Allen R R, et al. Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2011, 33(2): 220–30.
- [12] Spiegler M, Villapol S, Biran V, et al. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007 66(6): 481–90.
- [13] Ahmadi M, Rajaei Z, Hadjzadeh M A, et al. Crocin improves spatial learning and memory deficits in the Morris water maze via attenuating cortical oxidative damage in diabetic rats [J]. *Neurosci Lett*, 2017 642: 1–6.

Effects of ropivacaine on brain cell apoptosis and learning ability in neonatal mice

Li Qianhui, Xie Xiaojuan, Zhang Yilin

(Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023)

Abstract Objective To investigate the effects of ropivacaine on brain cell apoptosis and learning ability in neonatal mice. **Methods** 60 newborn mice were randomly divided into three groups, control group, low dose group and high dose group (20 mice/group). Mice in low dose group and high dose group respectively by micro syringe was given intraperitoneally 0.5% ropivacaine 20 μ l and 60 μ l. Mice in the control group was injected with 60 μ l saline. 6 mice in three groups after administration of 12 h were killed. Serum inflammatory factor serum (TNF- α , IL-1 β) were analyzed by ELISA. The mRNA expression level of pro-inflammatory cytokines and apoptosis related protein was analyzed RT-PCR and Western blot. The apoptosis of cerebral tissue staining was analyzed by TUNEL. Another 60 old newborn rats were randomly divided into control group, low-dose group and high-dose group (20 mice/group). After treatment for 29 days, the ability of learning and memory of mice was analyzed by Morris level maze test. **Results** Compared with the control group, TNF- α and IL-1 β mRNA and protein levels in the brain tissue and serum of the low dose group and high dose group significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of Bax and Caspase-3 in the low-dose group and high-dose group significantly increased, and the level of Bcl-2 significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the apoptosis of brain tissue in the low dose group and the high dose group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the low dose group, the level of apoptosis in the high dose group increased more significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group, in 29–32 d, low dose group and high dose group mice escape latency was prolonged at 31 d and 32 d, the high dose group escape latency was higher than the low dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Ropivacaine can induce inflammation and apoptosis in the brain tissue of neonatal mice, thereby affecting the learning and memory ability of mice.

Key words ropivacaine; inflammation; apoptosis; learning ability