

咪达唑仑导致神经功能损伤及作用机制研究

杨蓉 孙振琴 谢文娟 聂斌 孙福邦
甘肃省武威肿瘤医院麻醉科,武威,733000,中国

【摘要】 目的:探讨镇静药咪达唑仑导致神经功能损伤及其机制。方法:将 72 只大鼠分为生理盐水对照组、咪达唑仑组、右美托咪定组三个组别,每组各 24 只,比较三组大鼠的神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、中枢神经特异性蛋白(central nervous specific protein, S100 β)、细胞死亡受体 Fas 水平、逃逸潜伏期、游泳速度、穿过原平台次数,对 NSE、S100 β 、Fas 病理切片进行分析。结果:与对照组和右美托咪定组相比,咪达唑仑组 NSE、S100 β 、Fas 水平较高,逃逸潜伏期较长,穿过原平台次数较少($P<0.05$)。结论:咪达唑仑对神经功能损伤以及学习记忆功能影响较大。

【关键词】 镇静药;咪达唑仑;右美托咪定;神经功能损伤

【中图分类号】 R964 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-1396.2021.03.002

Study on Nerve Function Injury Induced by Dazolam and Its Mechanism

YANG Rong, SUN Zhen-qin, XIE Wen-juan, NIE Bin, SUN Fu-bang

Department of Anesthesiology, Wuwei Cancer Hospital of Gansu Province, Wuwei, 733000, China

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the neurologic impairment induced by sedative midazolam and its mechanism. **Methods:** 72 rats were divided into normal saline control group, midazolam group, dexmedetomidine group, each group contained 24 rats. Neuron specificity enolization enzyme (NSE), central nervous specificity protein (S100 β), cell death receptor level of Fas, escape latency, swimming speed, through the original number were compared in three groups. The pathological sections of NSE, S100 β and Fas were analyzed. **Results:** In midazolam group, the levels of NSE, S100 β and Fas were higher, the escape latency was longer, and the number of passing through the original platform was less ($P<0.05$). **Conclusion:** Midazolam has a significant effect on neurological impairment and learning and memory functions.

【KEY WORDS】 sedative; midazolam; dexmedetomidine; neurological impairment

随着临床上麻醉药使用的推广,麻醉镇静对小儿智力发育造成的影响引起了人们的高度重视。相关的动物研究发现幼年动物长时间使用麻醉镇静药成年后的学习记忆会被损伤。临床研究发现,小儿手术麻醉和记忆力下降、注意力不集中、智力发育迟缓关系密切,尤其是多次手术麻醉损伤更大^[1]。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)是一种新型麻醉镇静类药物,

可保护发育期大脑。咪达唑仑(midazolam, MDZ)属于苯二氮草类药物,主要通过苯二氮草受体结合作用于大脑边缘系统与脑干网状结构,有顺行性遗忘、肌松、抗惊厥、催眠、镇静、抗焦虑等功效^[2]。咪达唑仑可以作用于 γ -氨基丁酸 A 型(gama-aminobutyric acid A, GABA_A)受体、转运因子蛋白(translocation protein, TSPO)发挥作用,体外相关研究发现,咪达唑仑可以有

效促使 CA1 椎体神经元生成更多的神经递体。内源性神经递体主要调节抑郁、焦虑情绪,也会参与神经保护、神经再生、进食、睡眠、惊厥、学习记忆等调节^[3]。本研究在镇静药咪达唑仑对神经功能损伤及作用机制研究中,发现咪达唑仑对幼鼠的神经功能损伤以及成年后大鼠的学习记忆功能影响较大。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康 SD 大鼠 72 只,鼠龄 60~80 日,平均体重(300 ± 23.43) g,购买于成都达硕生物科技有限公司动物实验中心,饲养于无菌、恒温及暗明交替的清洁级环境中,湿度 60%,温度(23~25) °C,大鼠自由进食,取水,饲养 7 d,使其适应环境,避免外界刺激。

1.2 试剂与仪器

生理盐水,购自天津药业焦作有限公司;咪达唑仑,购自江苏九旭公司;右美托咪定,购自江苏恩华公司;NSE 试剂盒,购自默沙克生物有限公司;S100β 试剂盒,购自默沙克生物有限公司;Tunel,购自瑞士 ROCHE 公司;蛋白激酶,购自美国赛默飞;水合氯醛,购自山东开普勒生物科技有限公司;PBS,购自兰州生物制品研究所。

Morris 水迷宫,上海欣软信息科技有限公司;UV-1600 型紫外分光光度仪,上海美谱达仪器有限公司;高速冷冻离心机,湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及给药

根据镇静药物不同,采用简单随机法将 72 只大鼠随机分为生理盐水对照组、咪达唑仑(midazolam, Mida)组、右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)组,每组大鼠各 24 只,实验经甘肃省武威肿瘤医院伦理学会批准。咪达唑仑组,皮下注射 2.4 mg·kg⁻¹的咪达唑仑,每天 1 次,连续注射 3 d,制备咪达唑仑模型;右美托咪定组,皮下注射 75 mg·kg⁻¹的 Dex,每天 1 次,连续注射 3 d,制备右美托咪定模型;对照组则每天给与同等剂量的生理盐水。若大鼠的躯体及双下肢呈回缩性颤动,尾巴出现痉挛性摆动等症状说明模型建立成功。

1.3.2 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

大鼠注射药物 6 h 后,收集尾静脉血,3 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,用神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE) ELISA 试剂盒和中枢神经特异性蛋白(central nervous specific protein, S100β) ELISA 试剂盒,检测三组大鼠 NSE^[4]和 S100β 水平。

1.3.3 Morris 水迷宫测试

水迷宫测试仪器为高 50 cm、直径 120 cm 的圆形水池,水的颜色为不透明黑色,在水池边缘设置等距离的 4 个标记点(东、西、南、北),在水池设置等分的 4 个象限。水池水深大约 30 cm,在第 3 象限的正中大约距离池壁 30 cm 处设置一个圆形透明站台,站台低于水面 1.5 cm。水温大约维持在(22.2 ± 0.3) °C。所有大鼠在实验前的 1 d 放到水中 2 min,以便对环境进行适应。实验要在隔音的房间内进行,站台、鼠笼、光源、水池等物件的位置保持不动。大鼠在给药后 2 个月进行水迷宫测试^[5-6]。

1.3.3.1 定位航行(place navigation test, PNT) 实验所需要的时间为 6 d,前 3 d 为训练,后 3 d 为测试。每只大鼠 1 d 要训练 4 次,每次都要从不同的象限随机选择入水点,每次实验的时间限制为 60 s,在实验时将大鼠面朝池壁轻轻的放入到水中,同时利用计算机对大鼠进入水中到达站台的时间(潜伏期)进行记录,将其作为学习记忆成绩。大鼠找到站台并爬上去以后让其停留大约 30 s。如果大鼠进入水中后 60 s 内没有找到站台或者是爬上站台,要将其放置到站台上停留 30 s,记录为 60 s。后将大鼠从站台上取下休息 ≥ 30 min,之后再作下一次训练。对大鼠找到平台的时间进行记录,也就是将逃逸潜伏期 4 次平均值作为数据记录。

1.3.3.2 空间探索(spatial probe test, SPT) 训练完成后的第二天进行空间探索,将平台撤除,对大鼠 60 s 内穿过原平台的次数进行记录,并将其作为空间记忆成绩。比较三组大鼠逃逸潜伏期、游泳速度、穿过原平台次数。

1.3.4 Fas 蛋白^[6]及海马区神经细胞损伤^[13]测定

将脑组织置于 4% 多聚甲醛中后固定,于 4 °C 冰箱内保存 48 h。脑组织石蜡包埋、切片、脱蜡,入甲苯胺蓝染色液中,置 60 °C 恒温箱 30~60 min,乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封固。石蜡包埋,连续切片,厚度 5 μm。应用 Fas 免疫组化试剂盒,在 400 倍光镜下观察每张切片海马区的阳性细胞。参考《The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition》选取海马 CA1 区域较完整的脑片进行染色,光镜下观察海马 CA1 区神经元尼氏体染色阳性细胞数。比较三组大鼠海马区 Fas 蛋白表达及神经元细胞损伤(大鼠神经元细胞数量)情况。

采用 DNA 断裂的原位末端标记法(TUNEL 法)检测神经元细胞损伤(大鼠神经元细胞数量)情况。

1.4 统计学方法

数据应用 SPSS18.0 进行分析,其中计数资料进

行卡方检验, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表达, 三组间比较采用单因素方差分析, Morris 水迷宫逃避潜伏期采用重复测量数据和多重比较的方差分析, 对引发大鼠神经功能损伤的相关因素进行多因素 Logistics 回归分析, $P < 0.05$ 提示有显著差异。

2 结果

2.1 NSE、S100 β 水平、Fas 蛋白表达

咪达唑仑会导致 NSE、S100 β 表达增加。咪达唑仑组 NSE、S100 β 水平高于生理盐水组、Dex 组 ($P < 0.05$), 生理盐水组与 Dex 组相比, 无明显差异 ($P > 0.05$), 见 Tab.1。Fas 蛋白表达水平由高到低顺序为 Dex 组、咪达唑仑组、生理盐水对照组, Dex 组 Fas 蛋白表达水平最高。

2.2 三组逃逸潜伏期对比

咪达唑仑导致大鼠潜伏期变长。在 d 4、d 5、d 6 咪达唑仑组逃逸潜伏期长于生理盐水组、Dex 组 ($P < 0.05$), 生理盐水组与 Dex 组相比, 无明显差异 ($P > 0.05$), 见 Tab.2。

2.3 三组游泳速度对比

咪达唑仑对大鼠游泳速度影响较小。三组游泳速度相比, 无明显差异 ($P > 0.05$), 见 Tab. 3。

2.4 三组穿过原平台次数对比

咪达唑仑导致大鼠穿过原平台次数减少。咪达唑仑组穿过原平台次数少于生理盐水对照组、Dex 组 ($P < 0.05$), 生理盐水对照组与 Dex 组相比, 无明显差异 ($P > 0.05$), 见 Tab. 4。

Tab. 1 Comparison of NSE and S100 β levels ($\bar{x} \pm s$)

Groups	<i>n</i>	NSE (ng·mL ⁻¹)	S100 β (ng·mL ⁻¹)	Fas (%)
Control group	24	2.03 \pm 0.21	0.28 \pm 0.05	1.85 \pm 1.65
Mida group	24	5.12 \pm 0.48	0.82 \pm 0.01	3.55 \pm 1.05
Dex group	24	2.12 \pm 0.18	0.30 \pm 0.04	6.54 \pm 1.35
F	/	13.305	12.222	4.348
P	/	0.000	0.000	0.001

Notes: Comparing the NSE and S-100 β in the three groups of rats, Mida group significantly increase the NSE and S-100 β .

Tab. 2 Comparison of escape latency ($\bar{x} \pm s$)

Groups	<i>n</i>	D 4	D 5	D 6
Control group	24	15.07 \pm 1.83	13.99 \pm 2.34	9.73 \pm 1.19
Mida group	24	24.12 \pm 2.32	18.70 \pm 2.21	13.61 \pm 1.24
Dex group	24	16.14 \pm 1.68	13.91 \pm 2.41	10.09 \pm 1.12
F	/	5.754	3.032	4.064
P	/	0.000	0.014	0.000

Notes: Midazolam significantly prolonged the escape latency of the rats.

Tab. 3 Comparison of swimming speed ($\bar{x} \pm s$)

Groups	<i>n</i>	D 4	D 5	D 6
Control group	24	343.12 \pm 29.12	335.54 \pm 59.86	259.33 \pm 32.86
Mida group	24	355.32 \pm 36.24	307.44 \pm 53.21	267.44 \pm 55.77
Dex group	24	361.97 \pm 34.43	312.22 \pm 51.88	271.24 \pm 45.49
F	/	1.243	1.643	1.432
P	/	0.353	0.245	0.264

Notes: Midazolam had little effect on the swimming speed of the rats.

Tab. 4 Comparison of times of passing through the original platform

Groups	<i>n</i>	Crossing the original platform times
Control group	24	3.64 ± 0.68
Mida group	24	3.24 ± 0.52
Dex group	24	3.59 ± 0.20
<i>F</i>	/	12.006
<i>P</i>	/	0.000

Notes: Midazolam reduces the number of times the rat crosses the original platform.

2.5 Fas 蛋白表达

咪达唑仑能够促进 Fas 蛋白的表达。与生理盐水

对照组相比,咪达唑仑组、Dex 组大鼠海马区 Fas 表达明显增加,且咪达唑仑组大鼠海马区 Fas 蛋白水平明显高于 Dex 组,具体结果见 Fig.1。

2.6 三组大鼠神经元数量

镇静药能够在一定程度上损伤神经元,与生理盐水对照组相比,咪达唑仑组、Dex 组大鼠神经元细胞数量明显减少,且咪达唑仑组大鼠神经元数量高于 Dex 组,具体结果见 Fig.2。

2.7 多因素 Logistics 回归分析结果

对引发大鼠神经功能损伤的相关因素进行多因素 Logistics 回归分析,结果显示 NSE (OR=3.15, *P*=0.00)、S100β (OR=3.68, *P*=0.01)、Fas (OR=2.79, *P*=0.03)、神经元凋亡 (OR=3.25, *P*=0.00) 均为引发大鼠神经功能损伤的独立危险因素,具体结果见 Tab.5。

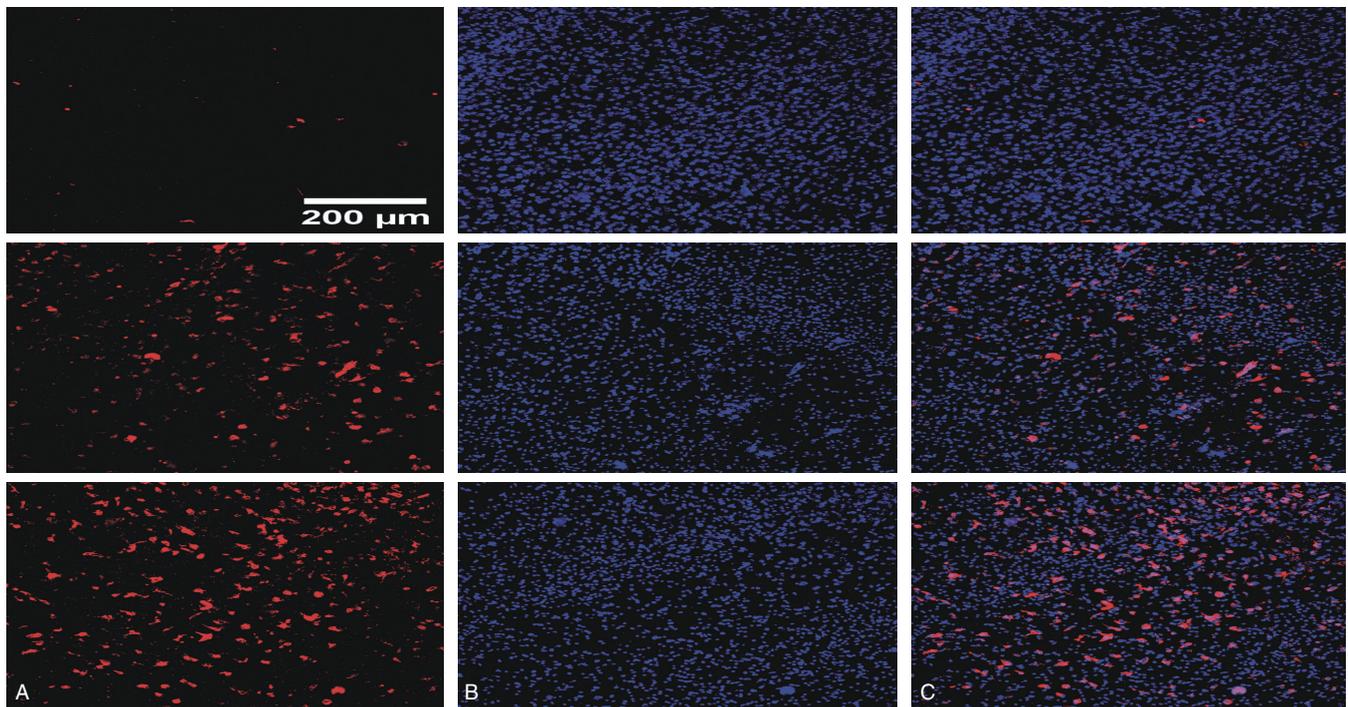


Fig. 1 Expression of Fas protein in three groups of rats

A: Fas expression in control group; B: Fas expression in Dex group; C: Fas expression in Mida group; Fas: C>B>A.

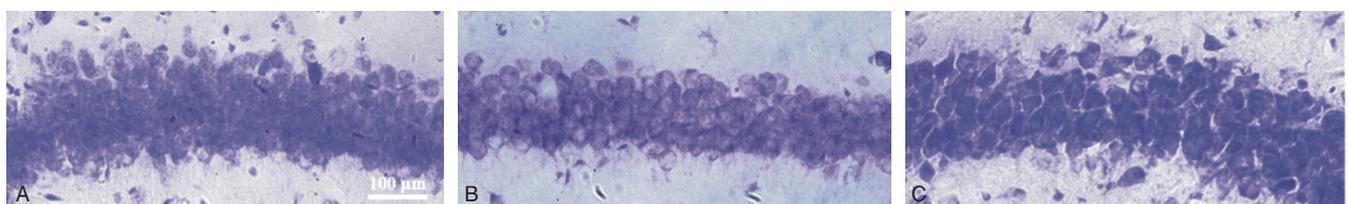


Fig.2 Apoptosis of neurons in three groups of rats

A: Neuronal cells in control group; B: Neuronal cells in Dex group; C: Neuronal cells in Mida group.

Tab.5 Multiple logistic regression analysis of risk factors of neurological injury in rats

Factors	Neurological complications				
	r	Wald	OR	95%	P
NSE	0.543	7.15	3.15	1.13	0.00
S100	0.643	5.35	3.68	1.04	0.03
Fas	0.689	2.18	2.79	1.18	0.46
neuronal apoptosis	0.795	6.82	3.25	1.28	0.01

Notes: NSE, S100 and Fas are all risk factors affecting the extension and functional impairment of rats.

3 讨论

随着医疗技术的不断进步,麻醉镇静药物的种类也越来越多,相关麻醉镇静药物对神经功能与学习记忆能力造成损伤的报道越来越多。比如老年患者手术麻醉后常发生认知功能障碍。麻醉镇静药物对小儿的智力发育影响也受到了临床的广泛关注。相关的离体研究显示,其可以导致发育期大脑细胞退化与凋亡的麻醉药物主要有丙泊酚、氯胺酮、地氟醚、氧化亚氮、安定、七氟醚、异氟醚、咪达唑仑等^[8]。但是,由于伦理等原因的限制,临床试验难以进行。对大鼠进行研究,主要是为了观察麻醉镇静药物对幼年动物的神经损伤以及成年后对学习记忆能力的影响,以便为临床患儿选择安全的麻醉镇静药物提供一定的科学依据。水迷宫是当前世界上评估大鼠空间学习记忆能力的一种模型。实验步骤主要有:①PNT 实验主要是评估大鼠对水迷宫的学习记忆获取能力。大鼠的潜伏期越短,学习记忆能力就越好;②SPT 实验主要是评估大鼠对平台的寻找情况,对平台空间位置记忆的保持能力。相同的时间中大鼠通过的原平台次数越多,学习记忆能力就越好。

本研究显示,咪达唑仑会对大鼠的 NSE、S100 β 水平进行调节。既往研究表明,脑脊液中的 NSE 与 S100 β 水平与患者的性别、年龄有紧密的联系,而血液中的 NSE 与 S100 β 水平与患者的性别、年龄无紧密的联系。NSE 与 S100 β 是当前临床上检测脑功能损伤、脑损伤的重要指标。同时检测 NSE 与 S100 β 水平可以反映患者的胶质细胞、神经细胞损伤程度。咪达唑仑

是当前临床上常用的镇静类药物,但是有相关研究发现,幼年大鼠每次皮下注射 9 mg·kg⁻¹ 的咪达唑仑就会使大脑神经细胞受到严重的损伤,甚至是凋亡^[9]。按照临床剂量对幼年大鼠连续注射 3 次咪达唑仑后,在大鼠成年后会有学习记忆能力降低的现象发生,这就说明,咪达唑仑会对幼年动物的大脑智力发育造成严重的损伤,且是不可逆的。

综上所述,与 Dex 相比,咪达唑仑对大鼠的神经功能损伤以及成年后大鼠的学习记忆功能影响更大。

参 考 文 献

- [1] 胡晓云,赵斌江,苏跃,等. 右美托咪定区域麻醉镇静对糖尿病老年患者术后认知功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2017,37(11):1296-1299.
- [2] Faramarz Mosaffa, Seyed Amir Mohajerani, Reza Aminnejad, et al. Preemptive oral clonidine provides better sedation than intravenous midazolam in brachial plexus nerve blocks [J]. Anesthesiology & Pain Medicine, 2016, 6(5):35-36.
- [3] 赵海康,杨磊,袁致海,等. 咪达唑仑在创伤性颅脑损伤患者镇静治疗中的应用及影响[J]. 中华脑科疾病与康复杂志:电子版, 2020,10(3):165-168.
- [4] 张江波,束汉生. 神经元特异性烯醇化酶在神经损伤中的研究进展[J]. 中华全科医学, 2016,14(1):125-127.
- [5] 韩耀国,张涛,叶明荣,等. 右旋美托咪啉对惊厥性癫痫持续状态大鼠认知功能和神经炎症的影响[J]. 安徽医药, 2019,23(7):1310-1314.
- [6] 肖华平,肖金仿,陶涛,等. 丙泊酚对新生鼠神经干细胞增殖及学习记忆的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2011,27(6):584-586.
- [7] 王志彦,路文婷,赵增海. 大鼠脑创伤后海马区 Fas 蛋白表达对神经细胞凋亡及学习记忆功能影响[J]. 中华临床医学研究杂志, 2005,7(17):2444-2446.
- [8] 郭岑,李欣然,李晓蕾,等. 咪达唑仑对小型猪不同脑区氨基酸类神经递质的影响[J]. 中国兽医杂志, 2017,55(5):36-38.
- [9] 管恩翠,孙金刚,王志胜,等. 咪达唑仑在结肠镜检查清醒镇静中对心肺功能的影响[J]. 重庆医学, 2017,68(23):60-63.