doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.009

蓝斑区去甲肾上腺素能神经元在 Orexin 促麻醉觉醒中的作用研究 *

李健楠 吴 畏 冉明梓 杨 岑 欧阳鹏荣 董海龙△

（第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032）

摘要 目的：探讨蓝斑区(LC)去甲肾上腺素能神经元在 orexin 促麻醉觉醒中作用。**方法：**应用异氟烷对成年 SD 大鼠进行麻醉，15 分钟后，将 SD 大鼠随机分为 6 组，分别注射 orexin-A/B (100pmol/0.3 μL) 及其溶剂 saline (0.3 μL)；orexin I 型受体拮抗剂 SB334867/ II 型受体拮抗剂 TCS-OX2-29(20 μg/0.3 μL及其溶剂 DMSO(0.3 μL)，通过观察大鼠翻正反射的消失和恢复时间，研究蓝斑区微注射 orexin 及其拮抗剂对异氟烷麻醉的诱导和觉醒的影响。**结果：**蓝斑区(LC)微注射四种试剂或其溶剂均对 SD 大鼠异氟烷麻醉的诱导时间无明显影响；蓝斑区(LC)微注射 orexin-A 能缩短 SD 大鼠异氟烷麻醉觉醒时间(P<0.001)，而微注射 orexinI 型拮抗剂 SB334867 能延长觉醒时间(P<0.001)；orexin-B、orexin II 型受体拮抗剂 TCS-OX2-29 对大鼠异氟烷麻醉的觉醒无明显影响。**结论：**蓝斑区(LC)的去甲肾上腺素能神经元介导了 orexin 的促麻醉觉醒作用。

关键词：Orexin；蓝斑；去甲肾上腺素；微注射；觉醒

中图分类号：Q95-3，R614 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2014)12-2239-03

Activation of Norepinephrine Neurons in Locus Coeruleus Mediates the Promotion Effect of Orexin on Anesthesia Emergence*

LI Jian-nan, WU Wei, RAN Ming-zi, YANG Cen, OUYANG Peng-rong, DONG Hai-long△

(Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of norepinephrine neurons of the locus coeruleusin in the promotion effect of orexin in emergence of isoflurane anesthesia. **Methods:** Isoflurane (ISO) was used to anesthetize adult male SD rats, 15 minutes later, the rats were assigned into six groups, Orexin-A, orexin-B (100pmol/0.3 μL) and their solvent saline (0.3 μL), orexin receptor I antagonist SB334867, orexin receptor II antagonist TCS-OX2-29 (20 μg/0.3 μL for both) and their solvent DMSO (0.3 μL) were bilaterally microinjected into LC, respectively. The time of the loss of righting reflex (LORR) following anesthesia was recorded as induction time and the recovery of righting reflex (RORR) from cease of anesthesia were recorded as emergence time. **Results:** There was no different effect on the induction time of ISO by any of above six microinjections(P>0.05). Microinject orexin-A into LC significantly shortened the emergence time and orexin-A receptor I antagonis SB334867 prolonged the emergence time of ISO anesthesia (P<0.001). **Conclusion:** The norepinephrine neurons of LC at least partly mediated the promotion effect of orexin in anesthesia emergence.

Key words: Orexin ; LC; Norepinephrine; Microinjection; Emergence

Chinese Library Classification: **Q95-3，R614** **Document code: A**

Article ID: 1673-6273(2014)12-2239-03

前言

Orexin 是 1998 年首次被发现的一种新型神经肽类，分为 orexin-A 和 orexin-B 两个亚型，具有促进食欲的作用[1]。近来研究发现 orexin 在全身麻醉后的复苏中有促进觉醒作用，而阻断 orexin I 型受体后能延迟全身麻醉的觉醒[2-4]。机体的觉醒水平与上行网状激活系统紧密相关，上行网状激活系统活动性增加则机体的觉醒水平上升[5]。去甲肾上腺素能神经元胞体主要位于蓝斑区(LC)，作为上行网状激活系统的一条重要支路，去甲肾上腺素(NE)能神经元对机体觉醒水平的调节发挥重要作用[16,19]。因此，我们在蓝斑区微注射 orexin 及其受体拮抗剂，旨在探讨 orexin 对蓝斑区去甲肾上腺素能神经元的调节，并观察这种调节对异氟烷麻醉诱导和觉醒的影响。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

成年雄性 SD 大鼠 280-320 g(由第四军医大学实验动物中心提供)，实验动物环境为(24± 0.5 ℃)，湿度(60± 2%)，昼夜节律为光照时间 6:00 AM～6:00 PM，大鼠自由进食进水。在 10%水合氯醛麻醉下 (1 mL/kg，i.p.)，对大鼠行核团微注射套管埋置。用立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司，中国)引导在蓝斑区 (LC) 植入长度为 8 mm 微注射导管 (注射外管外径 0.48 mm、注射内管外径 0.30 mm、导管帽外径 0.30 mm 深圳市瑞沃德生命科技有限公司，中国)，坐参照标 Paxinos and Watson

* 基金项目：国家自然科学基金项目(30972853；81128005；81371510)

作者简介：李健楠，男，硕士研究生，主要研究方向：全麻机制，TEL：18392139671，E-mail：24181367@qq.com

△通讯作者：董海龙，男，主任医师，博士研究生导师，TEL：(029)84775337，E-mail:hldong6@hotmail.com

（收稿日期：2013-12-23 接受日期：2014-01-18）

《The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates》第五版，以人字点(Lambda) 为参照原点，微注射部位为蓝斑区 (the locus coeruleus,LC) 坐标 AP,-3.4 mm;ML,± 1.2 mm;DV,-7.0 mm [6](由于注射内管比注射外管长 2 mm，注射外管深度为 -5.0 mm),然后用螺丝固定在颅骨上,用牙科胶粘合固定螺丝和微注射导管,并用导管帽密封微注射导管,手术后大鼠休息 5～7 天后进行实验。

1.2 诱导时间的观察

将在蓝斑区埋置微注射套管的动物随机分为 6 组(n=6)，在麻醉前第 15 分钟通过注射内管给予 orexin-A/B(100pmol/0.3 μL) 以及 saline (0.3 μL),SB334867/TCS-OX2-29 (20 μg / 0.3 μL)以及 DMSO(0.3 μL),微注射速度为 0.3 μL/5 min,注射过程中大鼠自由活动,注射完成后将大鼠置入自制的圆柱形透明麻醉箱(直径 25 cm,高度 30 cm)中 10 分钟,然后开启小动物麻醉机(氧流量 1.5 L/min,ISO 浓度设置为 2%)开始计时,观察大鼠翻正反射消失时间并记录。

1.3 觉醒时间的观察

将在蓝斑区埋置微注射套管的动物随机分为 6 组(n=6)，在自制的圆柱形透明麻醉箱(直径 25 cm,高度 30 cm)中预充异氟醚和氧气(1.5 L/min)使得 ISO 的浓度为 1.4% ,并且稳定该浓度 1 min 以上,然后将大鼠置入,在给予 ISO 后第 15 分钟通过注射内管给予 orexin-A/B(100pmol/0.3 μL)以及 saline(0.3 μL)，SB334867/TCS-OX2-29(20 μg/0.3 μL)以及 DMSO(0.3 μL),微注射速度为 0.3 μL/5 min,之后继续麻醉 10 分钟,使得总麻醉时间为 30 min,停止麻醉并保持氧流量不变,开始计时,观察大鼠翻正反射恢复时间并记录。

1.4 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS15.0 统计学软件进行 t 检验,以 P<0.05 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 蓝斑区微注射 orexin 对 SD 大鼠异氟烷麻醉诱导时间的影响

与稀释溶剂 Saline 相比，蓝斑区微注射 orexin-A/B (100pmol/0.3 μL)后,SD 大鼠异氟烷麻醉的诱导时间无显著差异 (P>0.05)。与稀释溶剂 DMSO 相比，蓝斑区微注射 SB334867/TCS-OX2-29(20 μg /0.3 μL)后,SD 大鼠异氟烷麻醉的诱导时间无显著差异(P>0.05)。

2.2 蓝斑区微注射 orexin 对 SD 大鼠异氟烷麻醉觉醒时间的影响

与稀释溶剂 Saline 相比，蓝斑区微注射 orexin-A (100pmol/0.3 μL)能明显缩短大鼠觉醒时间(P<0.001)。与稀释溶剂 DMSO 相比,蓝斑区微注射 SB334867(20 μg /0.3 μL)可明显延长觉醒时间(P<0.001);与稀释溶剂 Saline 和 DMSO 相比蓝斑区微注射 orexin-B(100pmol/0.3 μL)及 orexinII 型受体拮抗剂 TCS-OX2-29(20 μg /0.3 μL)没有引起明显的觉醒时间改变。

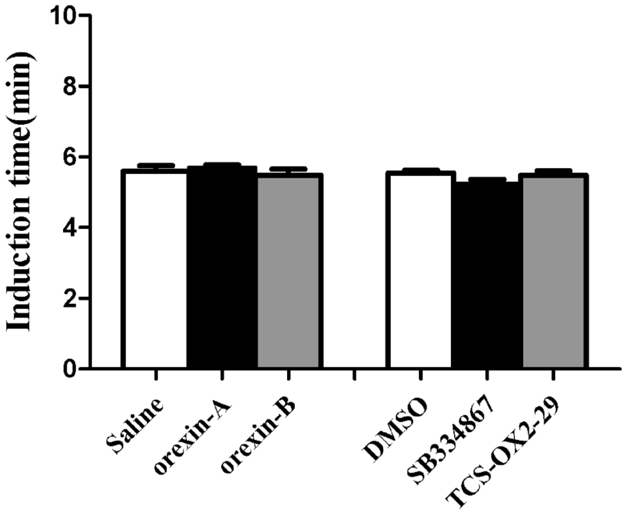
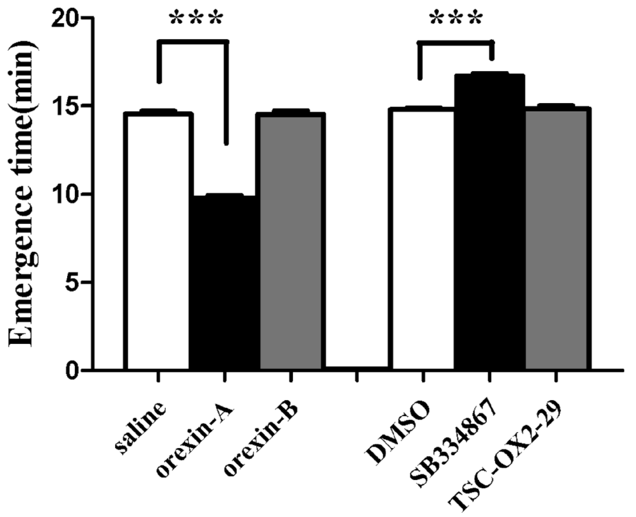


图 1 大鼠蓝斑区微注射 orexin-A/B 及其拮抗剂、溶剂后异氟烷麻醉的诱导时间比较(mean± SEMn=6)

Fig.1 Comparison of the induction time of isoflurane anesthesia by microinjection orexin-A/B into LC of rats (mean± SEM n=6)



注:***sline 与 orexin-A 相比,P<0.001;***DMSO 与 SB334867 相比,P<0.001

Note: ***sline vs orexin-A,P<0.001;***DMSO vs SB334867,P<0.001

图 2 大鼠蓝斑区微注射 orexin-A/ B 及其拮抗剂、溶剂后异氟烷麻醉的觉醒时间比较 (mean± SEM n=6)

Fig.2 Comparison of the emergence time of isoflurane anesthesia by microinjection orexin-A/B into LC of rats (mean± SEM n=6)

3 讨论

前期已经有大量的研究证实 orexin 能神经元参与了静脉丙泊酚麻醉和吸入麻醉的麻醉 - 觉醒过程的机制,特别是对麻醉终止后的觉醒过程有促进作用[5,7,10]。

近年来,在中枢神经系统,尤其是在大脑中,已有研究证实存在多个与睡眠 - 觉醒调节相关的神经递质系统,包括 GABA 能系统、胆碱能上行觉醒系统、组胺能系统、去甲肾上腺素能系统、多巴胺能系统等[14-18]。这些神经信号通路均被证实对睡眠 - 觉醒具有重要的调节作用[7,8,16]。在同一神经系统中,相互关联的几个核团间通过投射联系,共同构成一个发挥相同作用的神经通路[17,20]。

研究发现,与睡眠 - 觉醒调控密切相关的 orexin 能神经系统在麻醉 - 觉醒调控中也起重要作用[10,20]。Orexin 的激活可以部分逆转全麻药物的麻醉作用,使脑电波形由爆发性抑制向类

觉醒波形转变,同时通过利用脚桥被盖核(PPTg)电刺激模型和前脑基底核(BF)的 orexin 微注射,证实这种作用可能与 orexin 受体有关。最近的研究还发现,当停止给予全麻药物后,脑内 orexin 神经元活性及递质释放逐步恢复,且 orexin 在苏醒期释放量远高于其麻醉诱导前的基础值,表明全麻给药中止后机体的苏醒,可能不是传统观念认为全麻药物撤退后脑功能的被动复苏,而是有促觉醒物质活动参与的主动过程[11-13]。

本研究中,我们通过蓝斑区(LC)微注射的 orexin 及其拮抗剂,观察其对异氟烷觉醒时间的影响,发现在蓝斑区微注射 orexin-A 可以缩短大鼠的觉醒时间,而其拮抗剂 SB334867 可以逆转这一作用,这表明 orexin-A 可能部分通过蓝斑区起作用。因此,我们认为 orexin 可能通过兴奋 NE 神经元胞体细胞膜上的 orexin I 型受体,活化 NE 神经元,并促进 NE 投射区的去甲肾上腺素释放,上调上行网状激活系统活动性,从而对异氟烷麻醉起到促觉醒作用。但是必须指出的是,Orexin 并非单一地只是调节去甲肾上腺素能神经系统,其可能通过对多重递质的广泛调节最终促进麻醉的觉醒。

参考文献(References)

[1] Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(3): 171-181

[2] Nelson LE, Guo TZ, Lu J, et al. The sedative component of anesthesia is mediated by GABA (A) receptors in an endogenous sleep pathway [J]. Nat Neurosci, 2002, 5(10): 979-984

[3] Dong HL, Fukuda S, Murata E, et al. Orexins increase cortical acetylcholine release and electroencephalographic activation through orexin-1 receptor in the rat basal forebrain during isoflurane anesthesia[J]. Anesthesiology, 2006, 104(5): 1023-1032

[4] Dong HL, Niu J, Su B, et al. Activation of orexin signal in basal forebrain facilitates the emergence from sevoflurane anesthesia in rat [J]. Neuropeptides, 2009, 43(3): 179-185

[5] Zecharia AY, Nelson LE, Gent TC, et al. The involvement of hypothalamic sleep pathways in general anesthesia: testing the hypothesis using the GABAA receptor beta3N265M knock-in mouse [J]. J Neurosci, 2009, 29(7): 2177-2187

[6] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates[M]. Academic Press, 1998

[7] Hu S, Dong H, Luo Z, et al. Effects of remote ischemic preconditioning on biochemical markers and neurological outcomes in patients undergoing elective cervical decompression surgery: a prospective randomized controlled trial [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2010, 22(1): 46-52

[8] Zhang LN, Li ZJ, Tong L, et al. Orexin-A facilitates emergence from propofol anesthesia in the rat[J]. AnesthAnalg, 2012, 115(4): 789-796

[9] Dong H, Fan YH, Zhang W, et al. Repeated electroacupuncture preconditioning attenuates matrix metalloproteinase-9 expression and activity after focal cerebral ischemia in rats [J]. Neurol Res, 2009, 31: 853-858

[10] Sakurai T, Mieda M, Tsujino N. The orexin system: roles in sleep/wake regulation[J]. Ann N Y AcadSci 2010, 1200: 149-161

[11] Franks NP, Lieb WR. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors[J]. Nature, 1984, 310(5978): 599-601

[12] Franks NP, Lieb WR. Seeing the light: protein theories of general anesthesia. 1984[J]. Anesthesiology, 2004, 101(1): 235-237

[13] Franks NP. Molecular targets underlying general anaesthesia [J]. Br J Pharmacol, 2006, 147(Suppl 1): S72-81

[14] Dong HL, Fukuda S, Murata E, Higuchi T. Excitatory and inhibitory actions of isoflurane on the cholinergic ascending arousal system of the rat[J]. Anesthesiology, 2006, 104(1): 122-133

[15] Zhang HP, Yuan LB, Zhao RN, et al. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection by attenuating ubiquitin-conjugated protein aggregation in a mouse model of transient global cerebral ischemia[J]. Anesth Analg, 2010, 111(2): 506-514

[16] Dong H, Xiong L, Zhu Z, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induces tolerance againstspinal cord ischemia in rabbits[J]. Anesthesiology, 2002, 96(4): 907-712

[17] Dong HL, Zhang Y, Su BX, et al. Limb remote ischemic preconditioning protects the spinal cord from ischemia-reperfusion injury: a newly identified nonneuronal but reactive oxygen species-dependent pathway[J]. Anesthesiology, 2010, 112(4): 881-891

[18] Yuan LB, Dong HL (Co-first author), Zhang HP, et al. Neuroprotective effect of orexin-A is mediated by an increase of hypoxia-inducible factor-1 activity in rat [J]. Anesthesiology, 2011, 114 (2): 340-354

[19] 马国重, 蒋晓江. 去甲肾上腺素能神经元对觉醒水平的调节作用[J]. 神经疾病与精神卫生, 2012, 12(5): 530-532
Ma Guo-zhong, Jiang Xiao-jiang. Noradrenergic regulation of arousal level [J]. Journal of Neuroscience and Mental Health, 2012, 12(5): 530-532

[20] Kopp LA, Yost CS, Kindler CH. Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia [J]. Eur J Anaesthesiol, 2009, 26: 807-820