DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0353 **文章编号** 1671-8852(2025)04-0469-05

不同麻醉方式对骨质疏松骨折大鼠认知功能的影响及其机制

夏林智[1] 杨文超[2]
[1]武汉中西医结合骨科医院(武汉体育学院附属医院)麻醉科 湖北 武汉 430070；
[2]武汉市第四医院麻醉科 湖北 武汉 430030

摘要 目的：探究不同麻醉方式对骨质疏松骨折模型大鼠认知功能的影响及潜在机制。方法：实验大鼠分为：对照组、七氟醚组、丙泊酚组及复合麻醉组，每组10只；Morris水迷宫评价大鼠认知功能；尼氏染色观察大鼠神经元细胞数量变化；Western Blot检测大鼠脑海马组织γ-氨基丁酸A型受体($GABA_A$)、钾氯联合转运蛋白2(KCC2)蛋白表达。结果：复合麻醉组较七氟醚组、丙泊酚组在逃避潜伏期上显著降低，在目标象限持续时间、目标象限路程、穿越平台次数上显著升高($P<0.05$)，复合麻醉组大鼠神经元数量较对照组降低但差异无统计学意义($P>0.05$)；相较于七氟醚组、丙泊酚组，复合麻醉组大鼠神经元数量显著升高($P<0.05$)；复合麻醉组大鼠$GABA_A$蛋白表达高于七氟醚组、丙泊酚组($P<0.05$)，复合麻醉组大鼠KCC2蛋白表达高于七氟醚组、丙泊酚组但差异无统计学意义($P>0.05$)。结论：七氟醚全麻联合丙泊酚局麻的复合麻醉方式较两者单一麻醉方式对骨质疏松骨折术后大鼠认知功能的影响较小，且这一作用可能与上调$GABA_A$、KCC2蛋白表达有关。

关键词 麻醉方式；髋部骨折；认知障碍；γ-氨基丁酸A型受体；钾氯联合转运蛋白2
中图分类号 R274.1
文献标识码 A **开放科学(资源服务)标识码(OSID)：**

Influence of different anesthesia methods on cognitive function of rats with osteoporosis fracture and their mechanism

XIA Linzhi[1], YANG Wenchao[2]
[1]Dept. of Anesthesiology, Wuhan Orthopedic Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine (Affiliated Hospital of Wuhan Sports University), Wuhan 430070, Hubei, China;
[2]Dept. of Anesthesiology, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430030, Hubei, China

Abstract

Objective: To explore the influence of different anesthesia methods on the cognitive function of osteoporosis fracture rat models and their potential mechanisms. **Methods:** Experimental rats were divided into four groups: control group, sevoflurane group, propofol group, and combined anesthesia group, with 10 rats in each group. Cognitive function was evaluated using the Morris water maze. Nissl staining was used to observe changes in neuronal cell counts. Protein expression levels of γ-aminobutyric acid receptor A ($GABA_A$) and potassium-chloride co-transporter 2 (KCC2) in the hippocampus were detected using Western blot analysis. **Results:** Compared with the sevoflurane and propofol groups, the escape latency in the combined anesthesia group was significantly shorter, and the dura-

课题来源：湖北省科技计划项目(编号：2020BGB010)
作者简介：夏林智，男，1982—，医学硕士，主治医师，主要从事麻醉基础及临床研究，E-mail：xlz56785678@163.com

tion and distance in the target quadrant, as well as the number of platform crossings, were significantly increased ($P<0.05$). Additionally, the neuron count in the combined anesthesia group was lower than that in the control group, but this difference was not statistically significant ($P>0.05$). The neuron count was significantly higher in the combined anesthesia group than in the sevoflurane and propofol groups ($P<0.05$). $GABA_A$ protein expression was also higher in the combined anesthesia group than in the sevoflurane and propofol groups ($P<0.05$). Although the expression of KCC2 protein was higher in the combined anesthesia group than in the sevoflurane and propofol groups, this difference was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion:** The combined anesthesia method of sevoflurane general anesthesia and propofol local anesthesia has a smaller influence on cognitive function after osteoporotic fracture surgery compared to the single anesthesia method. This effect may be related to the upregulation of $GABA_A$ and KCC2 protein expressions.

Key Words Anesthesia Methods; Hip Fracture; Cognitive Impairment; Gamma-Aminobutyric Acid Receptor A; Potassium-Chloride Co-Transporter 2

骨质疏松症是一种全身性代谢性骨病,研究[1]显示,骨质疏松患者的骨折发生率在15%左右,其中最为常见且严重的则为髋部骨折。对于髋部骨折老年患者,若具备手术条件,均选择手术治疗,术后认知障碍则是这类患者术后常见的一种与麻醉和手术相关的中枢神经系统并发症[2]。麻醉主要通过阻滞神经信号的传递发挥作用,长时间的麻醉对人体血流及脑组织供氧都具有较大的影响,可通过诱导神经细胞的凋亡从而损伤患者的神经系统。目前麻醉方式较多,选取对患者认知功能影响较小的麻醉药物已成为当前麻醉学研究的热点。七氟醚、丙泊酚为临床常见麻醉药,但其对认知功能的影响及具体机制尚未完全阐明[3]。基于此,探究两者单一麻醉及复合麻醉对骨质疏松髋部骨折复位术后大鼠认知功能的影响,并对其潜在的作用机制进行探讨,旨在为骨质疏松骨折患者合理的麻醉方式选择提供依据。

1 材料方法

1.1 实验试剂及仪器 七氟醚(批号:20180103)购自上海恒瑞医药公司;丙泊酚(批号:20160809)购自北京费森尤斯卡比医药公司;水合氯醛购自美国Sigma-Aldrich公司;青霉素钠(国药准字H20013036)购自华北制药;尼氏染色液购自海博生物公司;γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid,GABA)A型受体($GABA_A$)、钾氯联合转运蛋白2(potassium-chloride co-transporter 2, KCC2)及GAPDH蛋白抗体均购自美国CST公司。

动物手术台购自浙江大学动物仪器厂;BW-MWM101型Morris水迷宫装置购自上海软隆科技公司;ECLIPSE 80i型荧光显微镜购自Nikon公司;LUNAR DPXIQ型双能X线骨密度仪购自美国GE公司。S/5型麻醉气体监测仪购自美国Ohmeda Detax公司。

1.2 实验动物 7周龄SPF级健康雌性SD大鼠55只,体质量(220±20) g,购自北京北科华夏生物医药科技有限公司,实验方案经动物伦理委员会审查批准。

1.3 模型构建

1.3.1 *骨质疏松骨折模型构建* 55只SPF级健康SD大鼠,适应性喂养1周后随机选取5只作为正常组、剩下50只大鼠则根据文献[4]进行骨质疏松模型构建。3个月后随机选取造模大鼠5只,参照文献[5]对5只正常组大鼠和5只模型大鼠,利用小动物micro-CT检测大鼠的骨密度,结果显示模型大鼠骨密度[(0.067±0.010) g·cm^{-2}]较对照组大鼠骨密度[(0.180±0.012) g·cm^{-2}]显著降低($t=16.176$, $P<0.001$),确定骨质疏松模型构建成功。参照文献[6]方法进一步构建骨质疏松髋部骨折模型,此模型构建过程中,有2只因手术和感染原因死亡,骨质疏松骨折模型构建成功大鼠为43只。

1.3.2 *实验分组及麻醉* 将骨质疏松骨折模型构建成功的43只大鼠随机分为对照组(10只)、七氟醚组(11只)、丙泊酚组(11只)及复合麻醉组(11只)。七氟醚组大鼠给予3%的七氟醚及40%的O_2(氧流速率为3 L·min^{-1})持续吸入3 h;丙泊酚组大鼠采用尾静脉注射丙泊酚(40 mg·kg^{-1})3 h;复合麻醉组则吸入1.7%七氟醚及40%的O_2(氧流速率为3 L·min^{-1}),同时静脉注射丙泊酚(20 mg·kg^{-1}),持续

3 h，至大鼠翻正反射消失则表示麻醉成功，对照组大鼠不做任何处理。实验过程中因麻醉原因七氟醚组和复合麻醉组各死亡 1 只。各组实验大鼠为对照组 10 只、七氟醚组 10 只、丙泊酚组 11 只及复合麻醉组 10 只。

1.3.3　髋部骨折复位术　实验组大鼠麻醉成功后，参考文献[7]进行髋部骨折复位术，对照组大鼠采用 10% 水合氯醛于腹腔注射麻醉后，进行同样操作的骨折复位术。丙泊酚组因手术原因死亡 1 只，各组实验大鼠为对照组、七氟醚组、丙泊酚组及复合麻醉组各 10 只。

1.4　Morris 水迷宫实验　大鼠髋部骨折复位术 8 d 后，进行 Morris 水迷宫实验，于每天固定时间对各组大鼠学习和记忆能力进行训练，每天 4 次，共训练 5 d。分别将大鼠面向池壁从 4 个象限的入水点放入水中，记录各大鼠在 120 s 内寻找到平台的时间，此时间即为逃避潜伏期，大鼠找到平台后，使其在平台停留 10 s。对于 120 s 内未能找到平台的大鼠，指引其找到平台并在平台上停留 10 s，将其潜伏期计为 120 s。逃避潜伏期结果为每天 4 次测定的平均值。再将平台撤去，将大鼠面向槽壁从目标象限的对称象限放入水中，记录 120 s 内大鼠到达目标象限持续时间、目标象限路程和穿越平台次数，各结果取 4 次实验平均值。

1.5　尼氏染色　水迷宫实验后，各组随机选取 5 只大鼠采用 10% 水合氯醛于腹腔注射麻醉，然后断头，取大鼠海马组织，做冠状位石蜡切片，脱蜡、脱水，加入尼氏染色液，染色后洗涤再脱水，于显微镜下随机选取 3 个切片海马角区视野，采用 Image Pro Plus 6.0 软件计数大鼠神经细胞，取 3 个视野的平均值。

1.6　Western Blot 检测蛋白表达　水迷宫实验后，取各组剩余 5 只大鼠采用 10% 水合氯醛于腹腔注射麻醉，然后断头，取大鼠海马组织。根据说明书提取海马组织总蛋白并测定浓度，调整蛋白浓度并添加上样缓冲液，95 ℃金属浴加热 10 min，最后利用 10% SDS-PAGE 电泳分离。电泳完成后进行电转、牛奶封闭、$GABA_A$ 和 KCC2 一抗孵育（一抗稀释比例：1∶1 000）、二抗孵育（二抗稀释比例：1∶5 000）、显影等操作，检测每个样本各个目的蛋白含量。以 GAPDH 蛋白作为内参对照。

1.7　统计学方法　本研究数据利用 SPSS 18.0 软件分析，实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。利用 GraphPadPrism 8 软件进行作图。多组间两两对比分析采用单因素方差检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果　复合麻醉组较七氟醚组、丙泊酚组在逃避潜伏期上显著降低，在目标象限持续时间、目标象限路程、穿越平台次数上显著升高（均 $P<0.05$），见表 1。

表 1　大鼠 Morris 水迷宫实验结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	逃避潜伏期/s	目标象限持续时间/s	目标象限路程/m	穿越平台次数/次
对照组	65.25±6.23	36.11±4.02	3.88±1.00	3.23±1.01
七氟醚组	88.39±7.51$^{\#\#\#}$	19.35±2.14$^{\#\#\#}$	2.12±0.64$^{\#\#\#}$	1.22±0.32$^{\#\#\#}$
丙泊酚组	76.44±7.06$^{\#\#\#**}$	25.06±2.11$^{\#\#\#***}$	2.66±0.55$^{\#\#\#}$	1.71±0.43$^{\#\#\#}$
复合麻醉组	70.28±6.52$^{\#\#\#\&}$	33.47±2.02$^{\#\#\#\&\&\&}$	3.39±0.61$^{\#\#\#\&}$	2.67±0.25$^{\#\#\#\&\&\&}$
F	25.908	76.098	11.617	24.158
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#\#}P<0.001$；与七氟醚组相比，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与丙泊酚组相比，$^{\&}P<0.05$，$^{\&\&\&}P<0.001$

2.2　各组大鼠海马组织神经元凋亡结果　七氟醚组、丙泊酚组大鼠神经元数量较对照组显著降低（均 $P<0.05$），复合麻醉组大鼠神经元数量较对照组降低但差异无统计学意义（$P>0.05$）；相较于七氟醚组、丙泊酚组，复合麻醉组大鼠神经元数量显著升高（$P<0.05$），见图 1。

2.3　各组大鼠 $GABA_A$ 和 KCC2 蛋白表达结果　七氟醚组、丙泊酚组和复合麻醉组大鼠 $GABA_A$、KCC2 蛋白表达较对照组均显著降低（均 $P<0.01$），复合麻醉组大鼠 $GABA_A$ 蛋白表达高于七氟醚组、丙泊酚组（$P<0.05$），复合麻醉组大鼠 KCC2 蛋白表达高于七氟醚组、丙泊酚组但差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 2。

3　讨论

认知功能主要指大脑的记忆和学习能力，是大脑主要高级功能之一，学习多指包括行为习惯、感知、思维在内的获得和发展。Morris 水迷宫实验也

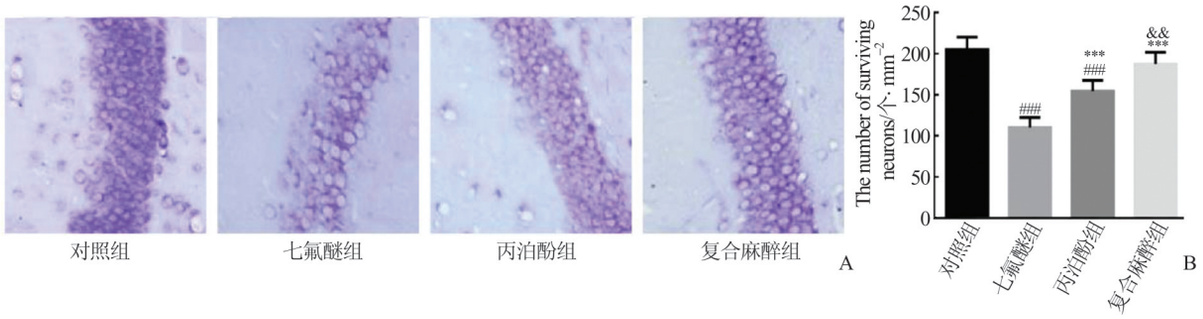


图1 各组大鼠脑海马组织神经元凋亡结果

A.大鼠海马组织尼氏染色图;B.大鼠海马组织神经元凋亡情况。与对照组相比,$^{###}P<0.001$;与七氟醚组相比,$^{***}P<0.001$;与丙泊酚组相比,$^{\&\&}P<0.05$

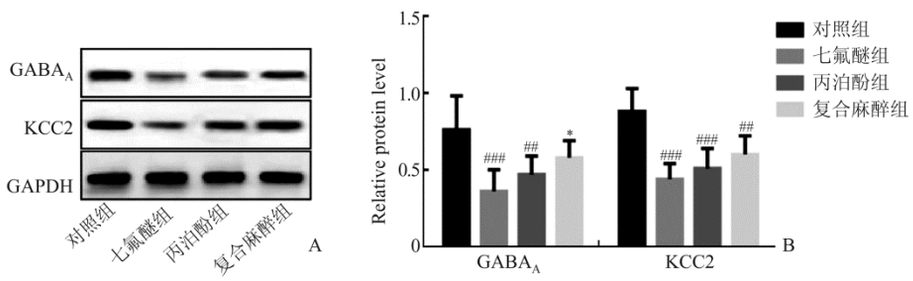


图2 各组大鼠脑海马组织GABA$_A$和KCC2蛋白表达

A.大鼠海马组织GABAA和KCC2表达蛋白免疫印迹图;B.大鼠海马组织GABAA和KCC2表达水平(相对表达量)。与对照组相比,$^{##}P<0.05$,$^{###}P<0.001$;与七氟醚组相比,$^{*}P<0.05$

是实验动物认知功能评价的重要实验之一,主要利用大鼠对陌生环境探究的学习性来检测其短期的记忆能力,通过软件系统记录大鼠的搜索目标所需时间、运动轨迹和速度等,评价大鼠的记忆情况[8]。本研究发现,复合麻醉组较七氟醚组、丙泊酚组在逃避潜伏期上显著降低,在目标象限持续时间、目标象限路程、穿越平台次数上显著升高。以上结果说明七氟醚复合丙泊酚麻醉较单纯麻醉的七氟醚组或丙泊酚麻醉更具优势。

GABA是神经系统重要的神经营养因子递质,广泛参与神经元的增殖、分化和蛋白质的合成。临床多数麻醉药物是通过结合GABA受体发挥神经抑制作用的。GABA受体主要包括A、B、C三种亚型。GABA$_A$受体主要位于大脑海马中,而人体海马的主要功能与学习记忆有关,当GABA与GABA$_A$受体结合时,会导致氯离子通道开放,进而使神经元膜电位超极化,抑制神经元的兴奋性,从而影响大脑对信息的处理、整合和记忆的形成。KCC2是具有Cl^-转运功能的转运蛋白,主要负责将胞内Cl^-转运至胞外,维持胞外高Cl^-浓度状态,为GABA$_A$受体提供了必要的生理环境[9]。此外,KCC2还被证实可调控GABA$_A$受体的表达,当KCC2蛋白功能正常时,神经元细胞膜上的GABA$_A$受体能够正常发挥抑制性作用,从而确保神经元在兴奋和抑制之间达到平衡,两者表达的降低在多种脑组织病变疾病中发生,显著影响了机体的认知功能。异氟烷和七氟醚等吸入全身麻醉药物主要通过GABA$_A$受体介导的突触抑制反应发挥镇静、催眠等作用。丙泊酚与GABA$_A$受体结合也是其发挥镇静催眠作用的重要前提。尼氏染色是一种主要用于显示脑和脊髓神经结构的碱性染色,通过染色神经元中的尼氏小体反映神经元的数量,进而评价神经元损伤情况。尼氏染色结果提示,七氟醚和丙泊酚对大鼠的神经均具有一定的损伤作用,复合麻醉对神经元损伤较轻。蛋白检测发现,复合麻醉组大鼠GABA$_A$蛋白表达高于七氟醚组、丙泊酚组,复合麻醉组大鼠KCC2蛋白表达高于七氟醚组、丙泊酚组但无显著性差异,提示七氟醚与丙泊酚麻醉对认知障碍的影响与GABA$_A$、KCC2蛋白的抑制有关。

综上所述,与七氟醚或丙泊酚单一麻醉方式相比,七氟醚全麻联合丙泊酚局麻的复合麻醉方式效果更好,有利于降低骨质疏松骨折患者术后认知障碍的发生,且这一作用可能与上调GABA$_A$、KCC2蛋白表达有关。

参考文献

[1] 黄海生，郑璐，杨波，等 . 老年骨质疏松性髋部骨折患者骨密度与铁代谢关联性的性别分层研究[J]. 广东医学，2023，44(6)：779-783.
HUANG H S，ZHENG L，YANG B，et al. Gender stratification study on association of bone mineral density with iron metabolism in elderly patients with osteoporotic hip fractures[J]. Guangdong Med J，2023，44(6)：779-783.

[2] 王洁，双鹏展，赵龙彪，等 . 老年患者髋部骨折修复术后谵妄的危险因素[J]. 临床麻醉学杂志，2023，39(3)：235-240.
WANG J，SHUANG P Z，ZHAO L B，et al. Risk factors of postoperative delirium in elderly patients undergoing hip fracture repair surgery[J]. J Clin Anesthesiol，2023，39(3)：235-240.

[3] ZHU J P，CHEN C，WU J F，et al. Effects of propofol and sevoflurane on social and anxiety-related behaviours in sleep-deprived rats[J]. Br J Anaesth，2023，131(3)：531-541.

[4] TAN T T，LI T，XIANG C，et al. Toosendanin inhibits osteoclast formation and alleviate postmenopausal osteoporosis by regulating the p38 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol，2023，116：109745.

[5] 赵阳，杨勇，孟志成，等 . 骨质疏松症动物模型构建方法的研究进展[J]. 山东医药，2023，63(4)：95-99.
ZHAO Y，YANG Y，MENG Z C，et al. Research progress on the construction method of animal model of osteoporosis[J]. Shandong Med J，2023，63(4)：95-99.

[6] 李彦冉，闫盼盼，苗艳艳，等 . 骨质疏松动物模型构建进展与应用特点分析[J]. 中国实验动物学报，2023，31(7)：928-934.
LI Y R，YAN P P，MIAO Y Y，et al. Establishment and application of osteoporosis animal models[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin，2023，31(7)：928-934.

[7] 申世源，蔡铭，吴成，等 . 红景天苷对髋部骨折术后肺部感染大鼠的干预效果[J]. 中华医院感染学杂志，2023，33(14)：2143-2147.
SHEN S Y，CAI M，WU C，et al. Effect of salidroside on hip fracture rats with postoperative pulmonary infection[J]. Chin J Nosocomiology，2023，33(14)：2143-2147.

[8] ZHANG J Y，YANG D Q，ZHAO J，et al. Ling-Gui-Zhu-Gan decoction alleviates cognitive deficits in Alzheimer′s disease by activating the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2/the antioxidant responsive element signaling pathway[J]. Curr Top Nutraceutical Res，2023，21(1)：1-9.

[9] YU Y H，TIAN D D，RI S，et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) suppresses hemocyte phagocytosis by binding to GABA receptors and modulating corresponding downstream pathways in blood clam，*Tegillarca granosa*[J]. Fish Shellfish Immunol，2023，134：108608.

（2024-05-12 收稿）
编辑　沈建国