

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.005

Orexin-1 受体参与调节老年大鼠异氟醚麻醉苏醒延迟*

张丽娜 武 婷 潘 旭 范栓琴 王 智[△]

(1 陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室 陕西 西安 710004; 2 西安交通大学口腔医院麻醉科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:探索 orexin 能神经系统是否参与调节老年大鼠异氟醚麻醉苏醒延迟及其具体机制。**方法:**选择雄性 SD 大鼠,将其分为老年大鼠组($n=6$, 20 月龄, 体重 600~800g)和青年大鼠组($n=6$, 3~4 月龄, 体重 230~250 g)。采用翻正反射恢复时间作为麻醉苏醒时间,记录异氟醚麻醉下老年大鼠和青年大鼠各自的麻醉苏醒时间;通过免疫荧光染色和细胞计数确定老年大鼠和青年大鼠神经元数目,放射免疫法检测两组大鼠血浆 orexin-A 含量;Western blot 检测老年大鼠和青年大鼠 orexin-1 和 -2 受体含量。**结果:**老年大鼠异氟醚麻醉苏醒时间明显长于青年大鼠($P<0.05$);老年大鼠 orexin 能神经元的数目与青年大鼠相比差异无统计学意义($P>0.05$),但其血浆 orexin-A 含量显著高于青年大鼠($P<0.05$);老年大鼠 orexin-1 受体在蛋白质表达中明显低于青年大鼠($P<0.05$),而 orexin-2 受体的表达与青年大鼠相比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**在老龄化过程中,虽然血浆中 orexin-A 含量代偿性增加,但是由于全脑中 orexin-1 受体含量的减少,使其并不能充分发挥促觉醒作用,这可能是导致老年人麻醉苏醒延迟的原因之一。

关键词: Orexin; 老年大鼠; 全身麻醉; 异氟醚

中图分类号: R-33; R338.2; R614 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)06-1020-04

Orexin-1 Receptor is Involved in Delayed Emergence of Aged Rats from Isoflurane Anaesthesia*

ZHANG Li-na, WU Ting, PAN Xu, FAN Shuan-qin, WANG Zhi[△]

(1 Key Laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Department of Anesthesiology, Hospital of stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate whether the orexinergic neurons was involved in the delayed emergence of aged rats from isoflurane anesthesia. **Methods:** Male SD rats were selected and divided into the aged group ($n=6$, twenty month, weighed 600~800 g) and the young group ($n=6$, three~four month, weighed 230~250 g). The return of righting reflex from isoflurane anesthesia was recorded as emergence time; the immunofluorescence and cell count were used to detect the number of orexinergic neurons, at the same time, the concentrations of orexin-A in plasma was detected by radioimmunoassay respectively; the expression of orexin-1 receptor and the orexin-2 were analyzed via western blot. **Results:** The emergence time of aged rats was longer than that of young adult ones in isoflurane anaesthesia ($P<0.05$). The number of orexinergic neurons showed no statistical difference between the aged and young groups ($P>0.05$), but the plasmic orexin-A levels were higher in the aged group than that in the young adult group ($P<0.05$). Otherwise, the expression of orexin-1 receptor of aged group was lower than that in the young group ($P<0.05$), but the expression of orexin-2 receptor showed no statistical difference compared with that of the young group ($P>0.05$). **Conclusion:** Although the content of orexin-A in plasma increases compensatively in the process of aging, the decreased expression of orexin-1 receptor in the whole brain makes it be unable to exert the arousal role, which may be one of the reasons leading to delayed recovery of anesthesia in the elderly from isoflurane anaesthesia.

Key words: Orexin; Aged Rats; General anesthesia; Isoflurane

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R338.2; R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)06-1020-04

前言

老年患者麻醉后苏醒延迟一直是困扰临床麻醉工作者的一个难题。在全球人口老龄化进程中,我国的人口老龄化速度更

快,数量庞大。伴随着老龄化,人的许多生理行为随之发生改变^[1,2]。通常认为老年患者代谢功能降低与觉醒延迟密切相关^[3,4]。

然而,针对与老年患者麻醉觉醒机制相关的觉醒神经通路及神经核团的变化却少有人关注,更无从研究纤维投射、受体密度

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81571351);国家自然科学基金青年基金项目(81701362, 81401138);

陕西省重点研发计划——一般项目社会发展领域项目(2018SF-057)

作者简介:张丽娜(1984-),女,博士,主治医师,电话:15891755136, E-mail: 847158073@qq.com

△ 通讯作者:王智,男,硕士,副主任医师,主要研究方向:全身麻醉药物作用机制, E-mail: 15891755136@163.com, 电话:18092548415

(收稿日期:2018-08-26 接受日期:2018-09-20)

变化对麻醉觉醒的影响,从而始终未从根本上阐述老年患者麻醉觉醒延迟的发生机制。

下丘脑 orexin 核团及其投射通路被证明是影响麻醉觉醒的关键环路^[5,6]。麻醉觉醒时,具有促觉醒作用的下丘脑 orexin 神经元活动性增强^[7,8]。随着老龄化的发生,orexin 神经能系统是否仍起促觉醒作用? 如果其发生退行性改变,是否导致老年患者麻醉觉醒延迟? 本研究拟以老年大鼠为研究对象,从神经元数目、递质释放、受体表达等多个层次,初步探究老龄化过程中,orexin 能神经系统发生的改变和调控作用的变化,以期揭示老年大鼠觉醒延迟的神经机制,明确老龄化过程中觉醒延迟的原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验采用雄性 SD 大鼠,青年组大鼠体重 230~250g,月龄 3~4 月,老年大鼠体重 600~800 g,月龄 20 月。青年大鼠由西安交通大学医学部实验动物中心提供,老年大鼠由成都生物科技有限公司动物中心提供。所有实验动物饲养在温度 (24±0.5)℃,相对湿度为(60%±2%)的动物房内。所有手术操作和麻醉觉醒时间的记录,均将大鼠放置于垫有加热毯的鼠板(保持温度为 37℃)上进行,以防动物因体温波动影响实验结果或意外死亡。

1.2 动物模型

本实验采用翻正反射恢复时间作为两组大鼠麻醉觉醒时间。将动物放入至透明麻醉笼中,麻醉笼一端连接麻醉气体延长管,另一端将麻醉气体引出管连接相应监测装置及取样装置。随后开始通入 1.4%的异氟醚,待两组动物翻正反射消失后,再麻醉 30 min,随后停止异氟醚吸入,翻动麻醉笼,如果大鼠恢复四肢和腹部朝下的状态,则认为翻正反射恢复,记录翻正反射恢复时间为麻醉觉醒时间。

1.3 免疫荧光染色和神经元计数

分别将青年组和老年组大鼠采用 0.9%生理盐水和 4%的多聚甲醛灌注,取出大脑做好标记,用 OCT 包埋后,置于 -20℃ 的冰冻切片机内冷冻,随后将脑组织切 10 μm 厚的脑片行免疫荧光双标染色。将脑组织浸入含小鼠抗 orexin-A (1:1000, MAB763, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)的一抗中,4℃ 孵育 48 小时,随后用磷酸盐缓冲液(pH=4.0)冲洗 3 次,每次 5 分钟。冲洗后加入驴抗小鼠(1:400, invitrogen, Carlsbad, CA)的荧光二抗中室温孵育 2 小时,随后再次冲洗 3 次后封片观察,并对老年大鼠和青年大鼠下丘脑后下部位的 orexin 神经元数目进行计数。

1.4 放射免疫法检测

将青年和老年大鼠尾侧朝向术者,用眼科剪剪开大鼠腹股沟皮肤,暴露股静脉,放置用肝素水浸溶过的聚乙烯软管(I.D. 58 mm; O.D. 965 mm; Becton Dickinson),并将聚乙烯管从大鼠皮下背部穿过固定于背部。两组动物在静脉管置入后休息 3 天,分别从股静脉抽血 0.5 mL,放入加入 EDTA 和抑肽酶的离心管内混匀。随后将离心管在 4℃ 条件下,以 12000 转离心 15 分钟,收集上清液。将两组大鼠的上清液进行 orexin-A 含量的检测,所用放免试剂盒为 RK-003-30(美国,菲克尼斯医药制品

公司)。

1.5 western blot 检测

用 12.5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离大鼠下丘脑组织蛋白,并将其转移至硝酸纤维素膜(WHWMAN, 美国)。在 4℃ 下,置于含有 5%脱脂奶粉的 1× TBST 中封闭 5 小时。随后,在 4℃ 下置于兔抗 orexin-1R(1:200, AB68 718, Abcam, 美国)的多克隆抗体,兔抗 orexin-2R(1:300, AB767 89, Abcam, 美国)的多克隆抗体和小鼠抗肌动蛋白多克隆抗体(1:1000, CATαA2066, Sigma, 美国)中孵育过夜。为了鉴定免疫反应带,用相应的辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔或抗小鼠(1:20000, GSGB-BIO, 中国)二抗,将膜在室温下孵育 1.5 小时。随后抗原带使用增强化学发光法(AsHSAM-PAMICAR BioTeePasCATWOWE, 美国)进行可视化发光显像。

1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件分析数据。计量资料以均数±标准误($\bar{x} \pm \text{SME}$)表示,两组间数据比较用非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 老年组和青年组大鼠在 1.4%异氟醚吸入麻醉作用下的觉醒时间比较

如图 1 所示,给老年大鼠吸入 1.4%异氟醚 30 min 后,大鼠麻醉觉醒时间为(1129±41.9)s;而青年组大鼠在吸入 1.4%异氟醚 30 min 后麻醉觉醒时间为(836.8±28.9)s,老年组大鼠麻醉觉醒时间较青年组显著延长($P < 0.01$)。

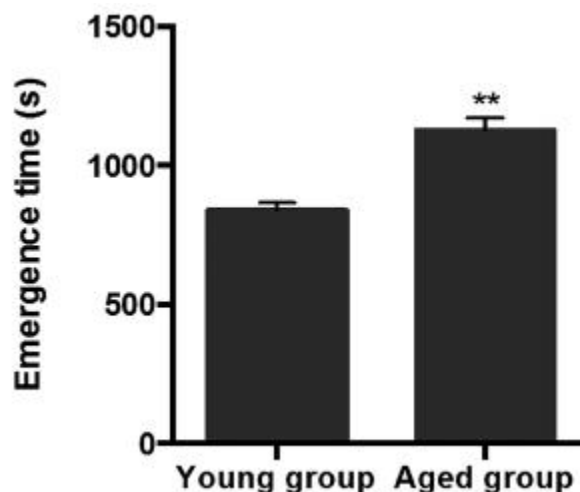


图 1 老年大鼠异氟醚麻醉觉醒时间显著延长

Fig. 1 The emergence time from isoflurane anaesthesia is significantly delayed in the aged rats (** $P < 0.01$, compared with the young group)

2.2 大鼠老龄化过程中 orexin 神经元数目的变化

如图 2(左)所示,应用免疫荧光染色法对大鼠下丘脑 orexin 神经元细胞进行计数,观察正常生理状况下青年大鼠(6 月龄)和老年大鼠(20 月龄)orexin 神经元形态和数目的变化,并进行细胞计数。结果如图 2(右)所示,青年大鼠下丘脑单侧 orexin 神经元数目约为(653.8±16.5)个,而老年大鼠下丘脑单侧 orexin

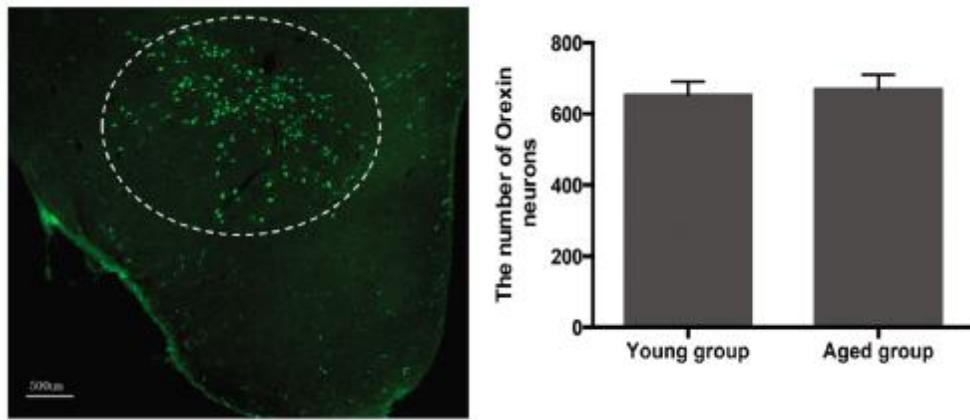


图2 老年和青年大鼠 orexin 神经元数目的比较

Fig. 2 Comparison of the number of orexinergic neurons between aged rats and young rats

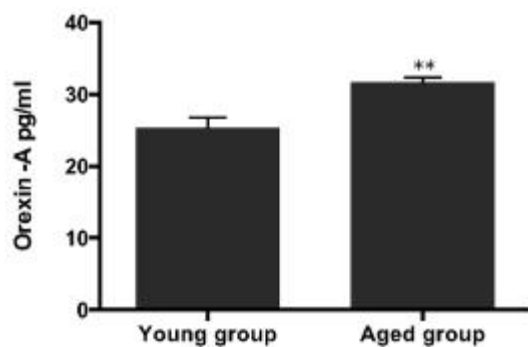


图3 老年和青年大鼠血浆中 orexin-A 含量比较

Fig. 3 Comparison of the concentration of orexin-A in plasma between aged rats and young rats

Note: ** $P < 0.01$, compared with young group.

神经元数目约为 (670 ± 18) 个,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示随着老龄化的发展,orexin 神经元数目无明显变化。

2.3 老年组和青年组大鼠血浆 orexin-A 含量比较

如图3所示,青年大鼠血浆 orexin-A 含量约为 (25.34 ± 1.45) pg/mL,而老年大鼠血浆 orexin-A 含量为 (31.64 ± 0.72) pg/mL。与青年组大鼠相比,生理状态下,随着年龄增加,大鼠血浆中 orexin-A 含量没有下降,反而显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 老年组和青年组大鼠全脑组织 Orexin-1 受体的表达比较

如图4显示,与青年组大鼠相比,老年大鼠全脑中 orexin-1 受体含量明显降低(图4,左),但老年大鼠和青年大鼠 orexin-2 受体在全脑中的蛋白含量比较差异无明显统计学意义(图4,右)。

3 讨论

有研究显示外科手术中老年人对阿片类药物的需求量仅为年轻患者的50%^[10],而静脉麻醉药如丙泊酚、瑞芬的剂量以及麻醉苏醒时间则更多决定于患者年龄而不是体重^[11],老年患者意识的恢复还和外界温度、手术时间的长短有关^[12-14]。另外,由丘脑-大脑皮质以及丘脑-下丘脑-大脑皮质组成的上行觉醒通路的功能退化也有可能导致老年患者麻醉苏醒延迟^[5, 15-17]。有研究报道,老年人皮层顶树突数目下降约28~37%,棘突数目下降约23%。与前人研究不同的是,虽然 orexin 能神经系统在吸入或静脉麻醉药的觉醒过程中具有促觉醒作用,但其在老年大鼠麻醉苏醒延迟中并无相关研究和报道,因此,本研究拟从觉醒相关神经元及其受体退行性改变的角度阐述老龄化导致苏醒延迟的可能原因。

通过对老年大鼠下丘脑 orexin 神经元的发现,我们发现随着老龄化的进程,老年大鼠 orexin 神经元数目无明显增加,但其血浆中 orexin 基础含量较青年大鼠多;在相同麻醉作用下,老年大鼠的觉醒时间仍然延长,orexin 似乎并未起促觉醒作

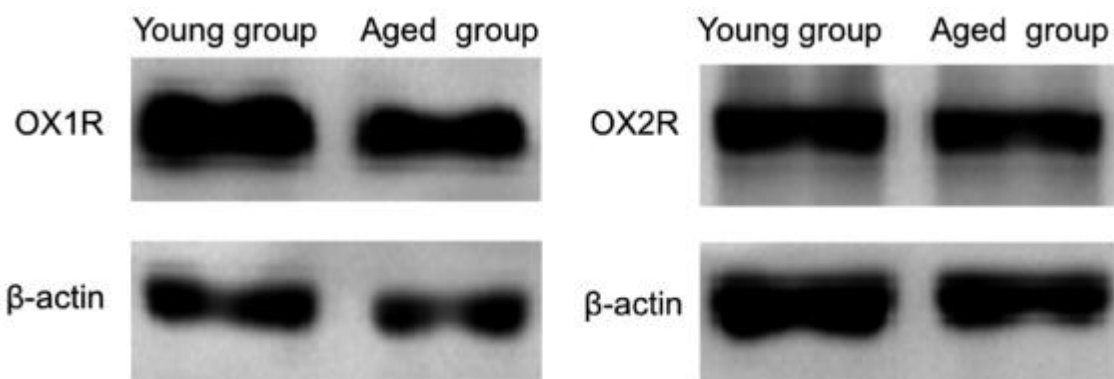


图4 老年大鼠和青年大鼠脑中 orexin-1 受体显著减少的表达比较

Fig. 4 Comparison of the expression of OX1R between aged rats and young rats

Note: ** $P < 0.01$, compared with young group.

用。类似的结果早在 2002 年一项临床研究就有发现, orexin-A 的血浆浓度与人的年龄有关, 大于 60 岁的老年男女血浆 orexin-A 含量远远大于小于 39 岁的青年男女^[18]。近期一项临床骨科颈椎手术麻醉实验显示在排除肝肾代谢对麻醉觉醒的影响作用后, 麻醉前、麻醉中、麻醉后和恢复期, 老年患者在各时间点血浆 orexin-A 含量均高于青年患者, 但觉醒时间仍显著长于青年患者^[19]。本研究所示老年大鼠血浆中 orexin-A 含量与前人临床测得的研究结果相符合。这些结果提示尽管麻醉觉醒时 orexin 血浆含量增多, 但在老龄化过程中, 发挥作用的 orexin 由可能减少, 因此并不能在老年患者或者老年大鼠的麻醉觉醒期发挥促觉醒作用。结合既往 orexin 神经元在睡眠、代谢中其退行性改变的研究, 我们推测 orexin 的退行性改变可能导致老年患者麻醉觉醒时促觉醒物质的作用减弱。

神经肽 orexin-A 必须通过作用于不同脑区的 orexin 受体才能发挥作用。一项研究报道随年龄增长, orexin-1 受体的信使 RNA 仅在海马有表达, orexin-2 受体的信使 RNA 在脑的广泛区域都有降低趋势, 并提出这种降低可能与老年人睡眠问题有关。随后, 有报道进一步指出老年大鼠 orexin 前基因表达、脑中神经肽 orexin-A 和 orexin-B 含量降低。在老年大鼠、猫、猕猴等不同种属动物中, orexin 神经元向睡眠、觉醒有关核团的神经投射减少, 例如中缝背核、蓝斑核、侧被盖核等^[14, 17, 20]。以上研究提示随着老龄化进程, orexin 能系统发生退行性功能减退。本研究发现 orexin-1 和 orexin-2 受体表达密集的下丘脑组织中, 与 orexin-A 亲和力较高的 orexin-1 受体含量显著下降, 而 orexin-A 又是发挥主要促觉醒作用的神经肽 orexin 亚型, 因此, 我们推测老龄化过程中, orexin-1 受体含量的降低是导致苏醒延迟的原因之一。

综上所述, 老龄化过程中, 虽然血浆中具有促觉醒作用的 orexin-A 含量代偿性增加, 但是由于全脑中 orexin-1 受体含量的减少, 使其并不能充分发挥促觉醒作用, 这可能是导致老年人麻醉苏醒延迟的原因之一。本研究为预防老年患者苏醒延迟或者术后认知功能障碍的发生和治疗提供了新思路。

参考文献(References)

- [1] Badran A, Hollocks MJ, Brookes RL, et al. Framingham vascular age is associated with worse cognitive performance in the middle-aged and elderly[J]. *Neuropsychology*, 2018, 1(0): 1-10
- [2] Choi KH, Kang J, Kim SM, et al. Cognitive remediation in middle-aged or older inpatients with chronic schizophrenia: a randomized controlled trial in Korea[J]. *Frontiers in psychology*, 2017, 8(12): 23-34
- [3] Herminghaus A, Loser S, Wilhelm W. Anesthesia for geriatric patients: Part 2: anesthetics, patient age and anesthesia management [J]. *Der Anaesthetist*, 2012, 61(4): 363-374
- [4] Waring RH, Harris RM, Mitchell SC. Drug metabolism in the elderly: A multifactorial problem?[J]. *Maturitas*, 2017, 100(11): 27-32
- [5] Sabetghadam A, Grabowiecka-Nowak A, Kania A, et al. Melanin-concentrating hormone and orexin systems in rat nucleus incertus: Dual innervation, bidirectional effects on neuron activity, and differential influences on arousal and feeding[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 139(0): 238-256
- [6] Sharma R, Sahota P, Thakkar MM. Melatonin promotes sleep in mice by inhibiting orexin neurons in the perifornical lateral hypothalamus [J]. *Journal of pineal research*, 2018, 65(2): e12498
- [7] Zhang LN, Li ZJ, Tong L, et al. Orexin-A facilitates emergence from propofol anesthesia in the rat[J]. *Anesthesia and analgesia*, 2012, 115(4): 789-796
- [8] Zhang LN, Yang C, Ouyang PR, et al. Orexin-A facilitates emergence of the rat from isoflurane anesthesia via mediation of the basal forebrain[J]. *Neuropeptides*, 2016, 58(0): 7-14
- [9] Brown EN, Purdon PL. The aging brain and anesthesia [J]. *Current opinion in anaesthesiology*, 2013, 26(4): 414-419
- [10] Yao ZY, Jia Z, Xie YH, et al. Analgesic effect of dezocine in different doses on elderly patients undergoing abdominal operation under general anesthesia and its influence on stress response to postoperative tracheal extubation[J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2017, 21(22): 5223-5229
- [11] Yu W. Anesthesia with propofol and sevoflurane on postoperative cognitive function of elderly patients undergoing general thoracic surgery [J]. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 2017, 30(3): 1107-1110
- [12] Tsai HJ, Chen CC, Chang KY. Patients and surgery-related factors that affect time to recovery of consciousness in adult patients undergoing elective cardiac surgery[J]. *JCMA*, 2011, 74(8): 345-334
- [13] Hu A, Qiu Y, Zhang P, et al. Comparison of the effect of high versus low mean arterial pressure levels on clinical outcomes and complications in elderly patients during non-cardiothoracic surgery under general anesthesia: study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2017, 18(1): 554-556
- [14] Sanfilippo M, Wefki Abdelgawwad Shousha AA, Paparazzo A. Emergence in elderly patient undergoing general anesthesia with xenon[J]. *Case reports in anesthesiology*, 2013, 20(13): 736-790
- [15] Evered L, Scott DA, Silbert B. Cognitive decline associated with anesthesia and surgery in the elderly: does this contribute to dementia prevalence?[J]. *Current opinion in psychiatry*, 2017, 30(3): 220-222
- [16] Chemali JJ, Kenny JD, Olutola O, et al. Ageing delays emergence from general anaesthesia in rats by increasing anaesthetic sensitivity in the brain[J]. *British journal of anaesthesia*, 2015, 115(1): i58-i65
- [17] Prober DA. Discovery of hypocretin/orexin ushers in a new era of sleep research[J]. *Trends in neurosciences*, 2018, 41(2): 70-72
- [18] Matsumura T, Nakayama M, Nomura A, et al. Age-related changes in plasma orexin-A concentrations [J]. *Experimental gerontology*, 2002, 37(8-9): 1127-1130
- [19] Wang ZH, Ni XL, Li JN, et al. Changes in plasma orexin-A levels in sevoflurane-remifentanyl anesthesia in young and elderly patients undergoing elective lumbar surgery[J]. *Anesthesia and analgesia*, 2014, 118(4): 818-822
- [20] Schwartz MD, Nguyen AT, Warriar DR, et al. Locus coeruleus and tuberomammillary nuclei ablations attenuate hypocretin/orexin antagonist-mediated REM Sleep[J]. *eNeuro*, 2016, 3(2): 34-38