论著

文章编号:1000-5404(2005)-2042-03

氯胺酮对SD幼鼠海马神经元细胞凋亡和突触素表达的影响

陈志斌,杨天德 (第三军医大学新桥医院麻醉科,重庆 400037)

提 要:目的 观察氯胺酮对7 d龄SD幼鼠海马神经元细胞凋亡和突触素(P38)表达的影响。**方法** 7 d龄SD幼鼠共30只,随机分成3组,分别注射氯胺酮25 mg/kg(K_1组)、50 mg/kg(K_2组),对照组注射生理盐水50 ml/kg(K_0组),24 h后取材,采用Tunel法检测神经元细胞凋亡,免疫组化染色和Western blot技术检测SD幼鼠海马突触素的表达,进行图像分析。**结果** 注射氯胺酮后24 h,海马神经元细胞凋亡计数K_0组(5.3±1.7)、K_1组(9.5±4.2)、K_2组(23.4±7.6),免疫组化染色突触素灰度值:K_0组为(174.11±4.68),K_1组为(181.36±4.17),K_2组为(198.25±3.06)。Western blot突触素蛋白电泳条带积分光密度值K_0组为(4 007±758),K_1组为(2 621±465),K_2组为(987±183)。**结论** 注射氯胺酮后24 h,SD大鼠海马神经元细胞大量凋亡,突触素表达减少可能和氯胺酮神经毒性有关。

关键词: 氯胺酮;海马;凋亡;突触素

中图法分类号: R322.81;R329.25;R971.2 **文献标识码:** A

Effect of ketamine on apoptosis and synaptophysin expression in hippocampal neural cell of SD infant rats

CHEN Zhi-bin, YANG Tian-de (Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of ketamine on apoptosis and synaptophysin expression in 7-day-old infant SD rat hippocampal neural cells. **Methods** Thirty SD rats of 7 days old were randomly assigned to receive the injection of 25 mg/kg ketamine (K_1 group) or 50 mg/kg (K_2 group) or 50 ml/kg normal saline (K_0 group). In 24 h after injecton, all rats were killed and the synaptophysin was tested by using immunhistochemistry and Western blotting, the apoptosis of neuronal cell by Tunel. **Results** In 24 h after injection of ketamine, the number of apoptotic neural cells increased, which of K_0 group was (5.3±1.7), K_1 group (9.5±4.2), K_2 group (23.4±7.6), and the grey values of synaptophysin by immunhistochemistry of K_0 group was (174.11±4.68), K_1 group (181.36±4.17), K_2 group (198.25±3.06), and the OD values of synaptophysin piece decreased, which of K_0 group (4 007±758), K_1 group (2 621±465), K_2 group (987±183). **Conclusion** In 24 h after treatment with ketamine, the expression of synaptophysin was decreased in hippocampl neural cells, the number of apoptotic neuronal cells were increased, which may be involved in neurotoxicity caused by ketamine.

Key words: ketamine; hippocampi; apoptosis; synaptophysin

氯胺酮是一种N-甲基-D-天冬氨酸(N-Methyl-D-aspartate, NMDA)受体的非竞争性拮抗剂,作为一种全身麻醉药,在人类和其他动物身上广泛应用,已有证据表明,可能导致潜在的精神行为的缺陷[1,2]。本研究拟通过对7 d龄SD幼鼠腹腔注射氯胺酮,观察神经元细胞的凋亡和突触素表达(P38)的变化,探讨其对海马神经元细胞发育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

6 d生SD大鼠30只购自本校实验动物中心,雌雄不拘,体质量(8.46±1.63)g,普通饲料喂养. 所有新生大鼠随机分成3组,每组10只。分别于第7天腹腔注射生理盐水50 ml/kg作为对照组(K_0组),氯胺酮25 mg/kg(K_1组),氯胺酮50 mg/kg(K_2组)。实验动物均于注射氯胺酮后24 h后戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,各组大鼠随机分成2部分,各5只,一部分断头取脑,剥离海马组织,制成组织匀浆用于做Western blot实验,一部分4%多聚甲醛灌注,断头取脑,全脑中后1/3连续冠状冰冻

作者简介:陈志斌(1973-),男,江西省樟树市人,硕士研究生,主治医师,主要从事重症手术全麻机制方面的研究。电话:(023)68755634

收稿日期:2005-05-06;修回日期:2005-08-12

切片，用于突触素（P38）免疫组化染色和凋亡检测。

1.2　主要试剂来源

dNTP 、PVDF 膜均购自罗氏公司，突触素（P38）抗体购自武汉博士德公司，组织细胞裂解液购自上海申能博彩公司，S-P 试剂盒购自北京中杉生物公司。

1.3　海马神经元细胞凋亡检测

每个标本取 3 张冰冻切片，采用“TUNEL”法，按试剂盒说明的步骤进行 DAB 染色。DAB 染色阳性细胞记数：计数 400 倍视野中的阳性细胞数，每组共随机观察 50 个视野，计算平均数。

1.4　海马神经元细胞突触素免疫组化染色

步骤参照蔡文琴主编《实用核酸分子与免疫组织化学技术》所介绍的方法和试剂说明书。每个标本取 3 张冰冻切片于 0.01 mol/L PBS 液漂洗 3 次，3% 过氧化氢孵育 30 min，0.01 mol/L PBS 液漂洗 3 次，加小鼠抗大鼠突触素抗体（1∶250），37 ℃孵育 1 h，4 ℃冰箱过夜；0.01 mol/ L PBS 液漂洗 3 次，正常血清工作液封闭 30 min，滴加二抗，37 ℃孵育 1 h，0.01 mol/ L PBS 液漂洗 3 次，滴加三抗，37 ℃孵育 30 min，0.01 mol/L PBS 液漂洗 3 次，滴加 DAB 显色液，3 min 左右用双蒸水终止反应。显微镜下观察，200 倍视野下数码成像，用德国 Laica 公司 Qwin 图像分析系统进行分析，在屏幕上用鼠标划出被检测区域，检测灰度值，以平均灰度值来进行分析。

1.5　Western blot 比较突触素表达

大鼠断头处死，冰台上操作，剥离出海马组织，称重。加入 RIPA 缓冲液（每克组织 10 ml RIPA），PMSF（每克组织 10 μl，10 mg/ml PMSF），匀浆、离心制成蛋白上清液。Bradford 比色法测定蛋白质浓度，取相同质量的细胞裂解液（体积 × 蛋白质浓度），并加等体积的 2 × 电泳加样缓冲液沸水煮 5 min，上样，电泳（5% 浓缩胶 80 mV，15% 分离胶 120 mV），半干法转膜（恒流 100 mA 1 h），使蛋白至 PVDF 膜，丽春红染色证明有蛋白条带，将 PVDF 膜放入塑料袋中，加封闭液（0.125 ml/cm^2），水平缓慢摇动 1 h，弃去封闭液，加入突触素抗体（用封闭液 1∶500 稀释），4 ℃冰箱过夜，TBST 洗涤 4 次，用封闭液 1∶1 000 稀释二抗，0.125 ml/cm^2 与 PVDF 膜密封于塑料袋中，室温水平轻摇 1 h，TBST 洗涤 4 次，双蒸水洗 3 次，将 PVDF 膜放入 DAB 显色液中轻摇至条带出现。PVDF 膜用凝胶成像分析系统进行光密度扫描，以蛋白条带积分光密度值表示染色强度。

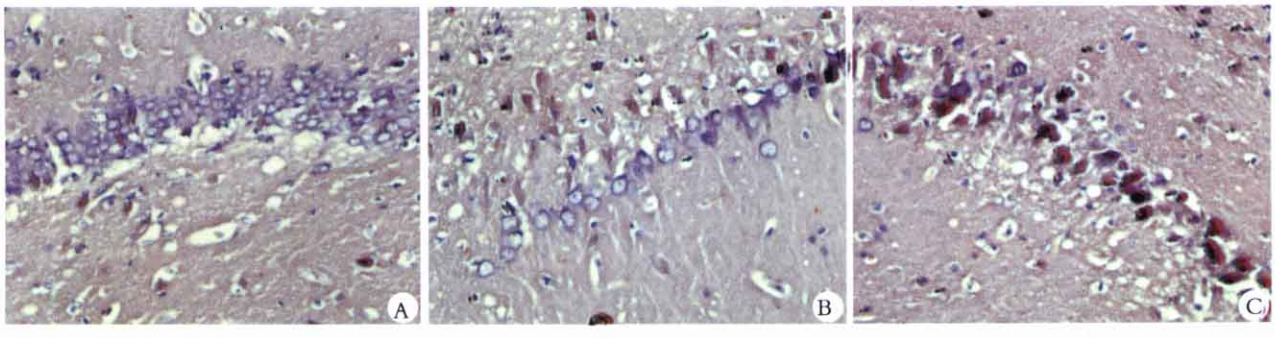
1.6　统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 软件包，各组均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　海马神经元细胞凋亡计数

普通显微镜下观察（图 1），凋亡细胞呈棕黄色，细胞结构不明显，注射氯胺酮后 24 h，凋亡细胞明显增多，凋亡细胞计数结果为：K_0 组（5.3 ± 1.7），K_1 组（9.5 ± 4.2），K_2 组（23.4 ± 7.6），K_2 组明显高于 K_0 组和 K_1 组。组间差异显著，组内两两比较有显著差异（$P < 0.05$）。



A：K_0；B：K_1；C：K_2

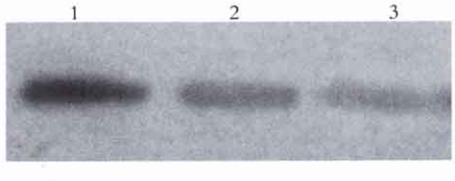
图 1　氯胺酮诱导的凋亡细胞　（S-P × 400）

Fig 1　Apoptosis of hippocampal neurons cells induced by ketamine　（S-P × 400）

2.2　突触素表达的改变

显微镜下观察，突触素呈棕黄色细颗粒，胼胝体和胶质细胞不着色，用之去背景。经德国 Laica 公司 Qwin 图像分析系统进行分析，K_0 组灰度值为（174. 11 ± 4. 68），K_1 组灰度值为（181.36 ± 4.17），K_2 组灰度值为（198.25 ± 3.06）。K_1 组和 K_2 组明显比 K_0 组高，各组间有显著差异（$P < 0.05$），说明在注射氯胺酮后突触素表达减少，突触数量和密度下降。

Western blot 检测（图 2），K_0 组突触素条带光密度值为（4 007 ± 758），K_1 组突触素条带光密度值为（2 621 ± 465），K_2 组突触素条带光密度值为（987 ± 183），各组间有显著性差异（$P < 0.05$），说明在注射氯胺酮后，突触素的表达明显下降。



1：K_0；2：K_1；3：K_2

图 2　Western blot 检测注射氯胺酮后 24 h 突触素的改变

Fig 2　Changes of synaptophysin expression in 24 h after ketamine injection by Western blotting

3 讨论

NMDA 受体(N-甲基-D-天冬氨酸受体)对发育中大脑有营养作用,促进神经元细胞的增殖、分化、迁移能力,对突触的可塑性有着重要作用[3,4]。在啮齿类动物大脑的快速发育期,NMDA 受体有一个高度敏感期,大约在出生到生后 2 周,抑制 NMDA 受体会导致大量的神经元凋亡。资料表明,这个时期给予 NMDA 受体拮抗剂如:苯环利定、MK-801,在各大脑区都引起了神经毒性和神经元细胞的凋亡和/或坏死。本研究表明,在注射氯胺酮后 24 h,引发海马神经元细胞的大量凋亡,亦证明了这一点。

突触素是一种相对分子量为 38×10^3 的钙结合糖蛋白,特异性位于轴突终末端的突触前囊泡膜上,是一种重要的囊泡膜标志蛋白[5]。光镜下所见到的颗粒状免疫反应阳性产物实际就是成簇排列的突触囊泡,对突触素免疫产物的定位和定量能够反映突触的分布和密度。突触素参与乙酰胆碱、谷氨酸等神经递质的释放过程,与突触可塑性关系密切。目前资料表明,突触素的表达受到很多因素的影响,Eastwood 等[6]在人脑齿状回及海马旁回中发现,突触素(SYN)与 SYN mRNA 存在正相关关系。这说明,突触素的表达受编码该蛋白的基因的调控。Nishi 等[7]发现,去除 5- TH 的脑皮质和海马中,SYN 的数量减少。这说明,5- TH 在发育过程中可以调节突触素的表达。脑源性神经营养因子对突触的形成具有一定的作用。电刺激损伤刚出生大鼠脑管区能改变突触素的分布形式 。给生后 1 ~7 d 大鼠注射肽能药物 crebrolysin 可以增加海马 SYN 免疫反应性突触前扣结的数量[8]。本研究表明,在注射氯胺酮后 24 h,引发大量的海马神经元细胞凋亡,并导致突触素表达的下降,二者的变化平行;Wang 等[9]亦发现,NMDA 受体拮抗剂 PCP 引发的凋亡,对随后的神经发生和突触构建产生消极影响,并导致突触素表达的下降。说明,NMDA 受体拮抗剂也是影响突触素表达的一个因素。但是,NMDA 受体引发凋亡的具体机制尚未明了,突触素表达的下降究竟是 NMDA 受体拮抗的直接后果还是继发于神经元细胞的凋亡,目前还不能作出结论。

通过免疫印斑技术得出的小鼠大脑中 SYN 的发育全貌与突触形成的时程相平行[10,11];Leclerc 等[12]以突触素作为神经发育的标记物对大鼠小脑皮质的发育状况进行了研究,发现突触素免疫物越多,神经发育越好。说明发育早期突触素的表达对中枢神经系统的发育和功能有密切关系,在发育早期突触素表达下降将影响中枢神经系统的功能和发育。乙醇是 NMDA 受体拮抗剂的一种,现以证明妊娠期间大量服用乙醇或者子宫内胎儿接触乙醇都会导致一种以颅骨异常、小头畸形、智力低下、精神发育迟缓为特征的神经发育综合征,称之为胎儿乙醇综合征(fetal alcohol syndrome, FAS)或胎儿乙醇影响(fetal alcohol effects, FAE)。乙醇引起的发育期神经元细胞的凋亡是 FAS 的重要原因。现已发现,给 7 d 幼鼠使用乙醇能导致广泛和极为严重的神经元凋亡变性[13],与同期给予 NMDA 受体拮抗剂导致的神经元凋亡分布类型一致。氯胺酮作为 NMDA 受体拮抗剂的一种,是否具有和乙醇类似的作用,目前尚少引起足够重视,亦少见相关报道,有待于进一步研究。本研究表明注射氯胺酮引起的海马神经元细胞凋亡和突触素表达的减少只是急性期的表现,远期表现和对精神活动的影响也有待进一步研究。

参考文献:

[1] Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, *et al*. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain[J]. Science, 1999, 283 (5398): 70 - 74.

[2] Hodgkinson R, Marx G F, Kim S S, *et al*. Neonatal neurobehavioral tests following vaginal delivery under ketamine, thiopental, and extradural anesthesia[J]. Anesth Analg, 1977, 56(4): 548A.

[3] Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors[J]. Science, 1993, 260(5104): 95 - 97.

[4] Guerrini L, Blasi F, Denis Donini S. Synaptic activation of NF-kB by glutamate in cerebellar granule neurons *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9077 - 9081.

[5] Wiedenmann B, Franke W W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles [J]. Cell, 1985, 41(3): 1017 - 1028.

[6] Eastwood S L, Burnet P W, McDonald B, *et al*. Synaptophysin gene expression in human brain: a quantitative in situ hybridization and immunocytochemical study[J]. Neuroscience, 1994, 59(4): 881 - 892.

[7] Nishi M, Whitaker Azmitia P M, Azmitia E C. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-TH 1A, agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists[J]. Synapse, 1996, 23 (1): 1 - 9.

[8] Windholz E, Gschanes A, Windisch M, *et al*. Two peptidergic drugs increase the synaptophysin immunoreactivity in brains of 6-week-old rats[J]. Histochem J, 2000, 32 (2): 79 - 84.

[9] Wang C, Anastasio N, Popov V, *et al*. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors by phencyclidine causes the loss of corticostriatal neurons [J]. Neuroscience, 2004, 125(2): 473 - 483.

[10] Knaus P, Betz H, Rehm H. Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain[J]. J Neurochem, 1986, 47 (4): 1302 - 1304.

[11] Stettler O, Tavitian B, Moya K L. Differential synaptic vesicle protein expression in the barrel field of developing cortex[J]. J Comp Neurol, 1996, 375(2): 321 - 332.

[12] Leclerc N, Beesley P W, Brown I, *et al*. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex[J]. J Comp Neurol, 1989, 280(2): 197 - 212.

[13] Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru M J, *et al*. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome[J]. Science, 2000, 287(5455): 1056 - 1060.

(编辑 栾 嘉)