论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1704-03

异丙酚对大鼠中枢神经核团一氧化氮合酶表达的影响

文欣荣[1],陶国才[1],范晓棠[2],张金海[2],胡 荣[2] (第三军医大学:[1]西南医院麻醉科;[2]基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过检测异丙酚静脉全麻诱导大鼠中枢一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的表达,探讨异丙酚的可能中枢作用位点。**方法** 采用NADPH-d酶组织化学法检测大鼠脑片的NOS阳性神经元在神经核团的分布。**结果** 异丙酚作用的大鼠伏核、外侧隔核、下丘脑室旁核、膝状体腹下核、背外侧膝状核、视上核、视交叉上核、视前腹侧核、弧束核、杏仁基底外侧核、丘脑室旁核、外侧缰核、海马回嗅觉小岛及乳头状核等核团NOS阳性神经元的表达明显减少,与对照组比较均非常显著差异($P<0.01$)。**结论** 异丙酚在大鼠中枢神经系统的作用部位与神经核团有关。

关键词: 异丙酚;中枢神经系统;一氧化氮合酶
中图法分类号: R338.2;R614.1;R971.2 **文献标识码:** A

Nucleus distribution of nitric oxide synthase in central nervous system in rat after anesthetization with propofol

WEN Xin-rong[1], TAO Guo-cai[1], FAN Xiao-tang[2], ZHANG Jin-hai[2], HU Rong[2] ([1]Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, [2]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To clarify the effective location of propofol in central nervous system (CNS). **Methods** Forty-two Wistar rats were ramdomized into control group, 50 mg/kg propofol, 100 mg/kg propofol, 150 mg/kg propofol, tail shearing, propofol followed by tail shearing ($n=7$ in each group). The NOS expressions in the CNS were recorded by NADPH-d histochemistry after anesthesia by intraperitoneal injection of propofol. **Results** Rather widely stained NOS positive neurons were observed in the control group. In propofol groups, the NOS expressions were decreased significantly as compared with the control group, mainly located in ACB, LS, Pe, VLG, Den, SO, SCh, AVPO, Sol, SuM, BL, PV, LHb and Icj, showing a negative dose-effect relation with propofol. **Conclusion** Propofol has the determined sites of action in CNS and the decrease of NO synthesis by the inhibition of NOS may play a role in propofol-induced general anesthesia.

Key words: propofol; central nervous system; nitric oxide synthase

静脉全身麻醉药异丙酚在中枢神经系统的作用部位至今仍不清楚。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种可逆性弥散的神经介质或信使物质,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是合成NO的关键酶,研究NOS阳性神经元在脑内的分布,可为认识大脑功能变化提供形态学依据[1]。本研究应用NADPH-d酶组织化学法检测NOS,研究异丙酚静脉麻醉在大鼠中枢神经系统的可能作用部位,旨在为进一步探讨异丙酚静脉全身麻醉机制提供形态学定位依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

异丙酚纯品由美国阿斯利康公司提供,还原型NBT及NADPH均为德国Boehringer Mannheim Corp (Roche)公司产品,Olympus显微镜。

1.2 动物模型

Wistar大鼠42只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量约150 g,雌雄不拘,随机分为空白对照组(C组,7只)、小剂量异丙酚组(50 mg/kg, P_1组,7只)、中等剂量异丙酚组(100 mg/kg, P_2组,7只)、大剂量异丙酚组(150 mg/kg, P_3组,7只)、断尾刺激组(S_1组,7只)、异丙酚作用后断尾刺激组(S_2组,7只)。将各组大鼠腹腔内注射相应剂量异丙酚后,麻醉1 h。C组为腹腔注射等量生理盐水, P_1组腹腔注射异丙酚50 mg/kg,

作者简介:文欣荣(1973-),男,四川省广安市人,硕士,主治医师,主要从事静脉全麻药物作用与基因表达方面的研究。电话:(023)68754200
通讯作者:陶国才,电话:(023)68754197
收稿日期:2006-03-01;修回日期:2006-05-15

P_2组腹腔注射异丙酚 100 mg/kg，P_3组腹腔注射异丙酚 150 mg/kg，S_1组腹腔注射等量生理盐水，S_2组腹腔注射异丙酚 100 mg/kg。S_1、S_2组大鼠在腹腔注射药物后，立即剪断其尾，并用止血钳钳夹鼠尾近心断端防止出血。断尾处理 1 h。

1.3　NADPH-d 酶组织化学法

各组动物分别于 1 h 后在 1% 戊巴比妥钠 100 mg/kg 腹腔注射麻醉下，立即用手术器械开胸，右心房开窗，经左室灌注生理盐水 300 ml 后，再灌注 4% 多聚甲醛（0.1 mol/L，PB，pH 7.4）300 ml，然后取全脑置于 30% 蔗糖（4% 多聚甲醛）液中后固定，4℃过夜，冠状冰冻切片，片厚 35 μm，连续切片，隔 5 取 1，用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次，入含 0.3% Triton 的 PBS 液中 30 min，然后将切片放入 NADPH-d 染色液（0.1 mol/L PB 配制，pH 7.3，含 0.1% 还原型 NADPH、0.01% NBT 和 0.03% Triton-X 100），37 ℃孵育 40 ~ 60 min。明胶贴片，晾干后经上行梯度乙醇脱水，二甲苯透明，D. P. X 封片。

1.4　统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行组间比较配对双尾 t 检验。

2　结果

用 NADPH-d 组织化学方法研究发现 NOS 阳性反应呈蓝色，阳性产物集中于细胞质和突起部分，细胞核不着色。神经元胞体形态多样化，呈梭形、三角形、圆形等多种形状，突起有一个或多个。神经核团的 NOS 阳性神经元以每个核团内的数目来表示（表 1，图 1、2）。

表 1　NOS 在大鼠中枢神经核团的表达

神经核团	C	P_1	P_2	P_3	S_1、	S_2
伏核	9.9 ±3.6	6.3 ±2.6[a]	4.2 ±1.6[ac]	1.5 ±0.7[ac]	9.4 ±3.0	4.5 ±1.2[a]
乳头状核	10.1 ±4.6	7.6 ±1.2[a]	5.5 ±1.3[ac]	2.5 ±0.6[ac]	9.9 ±2.6	5.2 ±1.6[a]
视交叉上核	16.5 ±4.4	6.5 ±2.4[a]	3.2 ±0.8[ac]	1.4 ±0.3[ac]	14.5 ±5.4	3.1 ±0.5[a]
视前腹侧核	10.3 ±4.6	7.3 ±0.6[a]	5.6 ±0.7[ac]	2.6 ±0.3[ac]	12.3 ±4.6	7.7 ±2.8[a]
弧束核	7.5 ±2.3	5.5 ±1.3[a]	3.9 ±1.2[ac]	1.8 ±0.4[ac]	8.5 ±3.3	3.0 ±1.1[a]
背外侧膝状核	11.7 ±5.8	6.7 ±2.8[a]	4.1 ±1.4[ac]	2.2 ±0.5[ac]	10.8 ±3.8	6.2 ±1.9[a]
膝状体腹下核	9.6 ±3.2	7.0 ±2.2[a]	4.8 ±1.5[ac]	1.7 ±0.5[ac]	10.6 ±3.2	5.2 ±1.4[a]
下丘脑室旁核	11.4 ±3.2	8.8 ±3.2[a]	5.4 ±2.1[ac]	2.2 ±0.4[ac]	12.0 ±4.2	3.9 ±1.6[a]
视上核	18.3 ±1.9	5.7 ±1.8[a]	3.4 ±1.4[ac]	1.7 ±0.6[ac]	17.6 ±3.6	3.7 ±1.0[a]
外侧隔核	15.3 ±5.2	6.5 ±2.6[a]	4.1 ±1.6[ac]	2.8 ±0.6[ac]	17.5 ±5.6	2.8 ±0.6[a]
外侧缰核	10.4 ±2.4	7.5 ±2.3[a]	5.1 ±1.3[ac]	2.3 ±0.6[ac]	15.4 ±7.7[b]	15.3 ±7.9[b]
海马回嗅觉小岛	13.8 ±5.0	6.6 ±2.5[a]	3.3 ±1.2[ac]	1.6 ±0.7[ac]	19.4 ±6.3[b]	17.5 ±5.6[b]
丘脑室旁核	7.8 ±2.2	4.3 ±1.2[a]	2.7 ±0.5[ac]	1.5 ±0.3[ac]	17.7 ±5.5[b]	18.2 ±4.2[b]
杏仁基底外侧核	13.5 ±3.9	7.4 ±2.9[a]	4.6 ±1.5[ac]	2.2 ±0.4[ac]	25.3 ±8.4[b]	27.6 ±6.6[b]

a：$P < 0.01$，与 c 组比较；b：$P < 0.01$，与 P1、P2、P3 组比较；c：$P < 0.01$，与 P1、P2 组比较

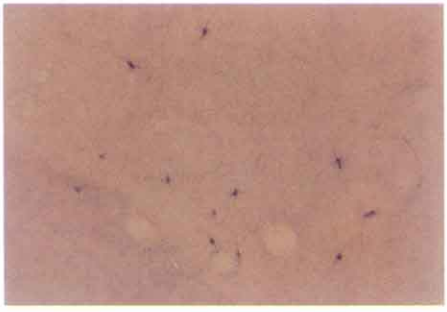


图 1　P1 组 NOS 在外侧隔核的表达　（酶组织化学 ×100）

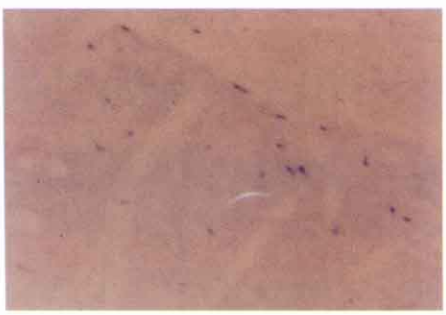


图 2　P2 组 NOS 在视上核的表达　（酶组织化学 ×100）

在 C 组大鼠脑内 NOS 阳性神经元分布相当广泛，几乎涉及所有区域：包括伏核（accumbens nucleus，ACB）、外侧隔核（lateral septal nucleus，LS）、下丘脑室旁核（periventericular hypothealamic nucleus，Pe）、膝状体腹下核（ventral lateral geniculalaten nucleus，VLG）、背外侧膝状核（dorsal endapiriform nucleus，Den）、视上核（supraotic nucleus，SO）、视交叉上核（suprachiasmatic nucleus，SCh）、视前腹侧核（anteroventral preoptic nucleus，AVPO）、弧束核（nucleus of the solitary tract，Sol）、杏仁基底外侧核（basolateral amygdaloid nucleus，BL）、丘脑室旁核（paraventricular thalamic nucleus，PV）、外侧缰核（lateral habenular nucleus，LHb）、海马回嗅觉小岛（islands of Calleja，Icj）及乳头状核（supramammillary nucleus，SuM）等核团，延髓分布较少。

P_1、P_2、P_3组大鼠中枢 NOS 阳性神经元较 C 组明显减少，在 ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol、SuM、BL、PV、LHb 及 Icj 等核团，P_1、P_2、P_3组 NOS 阳性神经元的表达分别与 C 组比较均有非常显著差异（$P < 0.01$），且 NOS 阳性神经元表达与异丙酚剂量负相关，P_3 与 P_1、P_2 比较有非常显著差异（$P < 0.01$），P_2 与 P_1 比较有非常显著差异（$P < 0.01$）。提示异丙酚抑制 ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol、SuM、BL、PV、LHb 及 Icj 等核团内的 NOS。

S_1组大鼠脑内 NOS 阳性神经元分布相当广泛，几乎涉及所

有区域，与C组比较在BL、PV、LHb及Icj等核团NOS阳性神经元表达明显增多，有非常显著差异（$P<0.01$），提示断尾刺激可能使BL、PV、LHb及Icj等核团内NOS增多。S_2组大鼠中枢ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol及SuM等核团NOS阳性神经元表达明显减少，分别与C组、S_1组比较有非常显著差异（$P<0.01$），提示S_2组大鼠中枢上述核团内NOS可能受到异丙酚抑制。但在BL、PV、LHb及Icj等核团S_2组NOS阳性神经元表达较P_1、P_2、P_3组明显增多，有非常显著差异（$P<0.01$），提示BL、PV、LHb及Icj可能参与大鼠中枢对断尾刺激的反应而引起NOS增多。

3 讨论

全身麻醉中枢作用部位的研究表明，突触有可能是神经组织结构上全麻作用的位点，但并非是大体解剖上的作用部位。徐礼鲜等[2]通过检测FOS蛋白及NOS的表达来研究吸入麻醉药物甲氧氟烷大鼠中枢作用位点，但在其研究的实验动物分组方面，未设置疼痛刺激组排除疼痛等刺激诱导的NOS表达对研究麻醉作用位点的影响；并且甲氧氟烷和硫喷妥钠等麻醉药刺激性较强，异丙酚可以使机体处于无意识状态而无其他特殊效应[3]，比较适合于全麻机制的研究。

NO是生物体内在NOS作用下，以L-精氨酸及分子氧为底物合成的一种结构简单的双原子自由基，可作为第二信使或细胞功能调节因子而参与体内一系列生理和病理条件下的生物过程，调节循环、神经、免疫等系统一系列的生理与病理活动，生物机体内的NOS至少发现有3种类型：神经型、内皮型、诱导型，前两者又总称为构成型，其活性依赖于Ca^{2+}/CaM的调节，作用迅速而短暂[4]。NADPH-d组化法是用NADPH和氯化硝基四氮唑蓝（nitroblue tetrazoline chloride，NBT）与固定后的脑切片一起孵育，NADPH-d阳性神经元可把NBT还原为不可溶的深蓝色formazan反应产物[5]。NADPH-d酶组织化学技术将中枢神经系统形态定位与细胞功能活动结合起来

用NADPH-d组织化学方法研究表明C组NOS阳性神经元在大鼠脑内的分布相当广泛，几乎涉及所有区域，阳性神经元大多呈多角形、梭形；还有一些呈圆形和卵圆形等，而且突起染色都很清晰。这一结果提示NO在大鼠脑内参与多种生理活动。尽管目前对NO的作用及作用机制的认识还不完全清楚，但大量的研究表明，NO是一种特殊的神经活性物质，其作用是多方面的。它不仅参与突触传递过程，而且还可以充当第二信使，具有介导兴奋性氨基酸的作用[6]。P_1、P_2、P_3组NOS在ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol、BL、PV、LHb、Icj及SuM核团表达急剧减少，且与异丙酚的剂量负相关，由此表明异丙酚麻醉作用机制与抑制NOS活性，使NO释放减少，从而发挥麻醉作用有关，同时支持这些部位可能为异丙酚的全身麻醉作用位点。S_1、S_2组NOS在PV、LHb、Icj及SuM等核团表达显著增多，表明NO可能在大鼠中枢的上述核团内的不同水平发挥痛觉调控作用[7]。

在研究方法上，由于NOS表达对于不同刺激选择性差，易受其他非实验因素的干扰，如光线、气味和应激的反应等，因此除了要严格控制合适的实验条件外，对于如何排除无关因素的干扰以求得结果的正确性是至关重要的。本实验采取以下措施：①大鼠于实验前放置在安静、温暖和避强光的饲养环境内24 h以上；②在实验操作时力求轻柔，尽量保持基础状态的稳定；③设置严格的对照组，除麻醉因素外其他条件相同，并设置异丙酚作用后断尾刺激组，排除麻醉因素外的刺激对异丙酚静脉全麻中NOS表达的影响；④异丙酚作用后注意维持大鼠呼吸、循环稳定。

综上所述，通过检测异丙酚刺激大鼠中枢神经系统NOS的表达，表明在中枢神经系统内有与异丙酚静脉全身麻醉功能相关的神经核团存在，推测异丙酚麻醉作用与抑制NOS活性、减少NO生成有关。而异丙酚静脉全身麻醉的具体机制，值得进一步探讨。

参考文献：

[1] MILNE B, HALL S R, SULLIVAN M E, *et al*. The release of spinal prostaglandin E2 and the effect of nitric oxide synthetase inhibition during strychnine-induced allodynia[J]. Anesth Analg, 2004, 93(3): 728-733.

[2] 徐礼鲜，张 惠，马加海，等. 吸入麻醉药诱导c-fos基因和一氧化氮合酶在大鼠中枢神经系统的共同表达[J]. 临床麻醉学杂志，2001, 17(3): 151-153.

[3] MADAN R, KAPOOR I, BALACHANDER S, *et al*. Propofol as a sole agent for paediatric day care diagnostic ophthalmic procedures: comparison with halothane anaesthesia[J]. Paediatr Anaesth, 2004, 11(6): 671-677.

[4] WIENCKEN A E, CASAGRANDE V A. The distribution of NADPH diaphorase and nitric oxide synthetase (NOS) in relation to the functional compartments of areas V1 and V2 of primate visual cortex[J]. Cereb Cortex, 2000, 10(5): 499-511.

[5] KONWLES R G, MONCADA S. Nitric oxide synthases in mammals [J]. Biochem J, 1994, 298(Pt 2): 249-258.

[6] 文欣荣，陶国才，范晓棠，等. 异丙酚麻醉对大鼠中枢神经核团c-jun基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2004, 26(21): 1954-1956.

[7] KUKUSHKIN M L, GRAFOVA V N, SMIRNOVA V S, *et al*. The role of nitric oxide in mechanisms of the development of pain syndrome [J]. Anesteziol Reanimatol, 2002, (4): 4-6.

（编辑 栾 嘉）