文章编号:1000-5404(2008)04-0337-03

论著

咪达唑仑对幼龄大鼠大脑神经元 caspase-3 活化的影响

王国毅,陶国才,易 斌,崔 剑 (第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察咪达唑仑对幼龄SD大鼠大脑皮层神经元半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶-3活化(caspase-3 activation)的影响。**方法** 出生7 d SD大鼠64只,雌雄不拘,分为A、B 2部分。A部分24只,分为4组($n=6$):A1为未给予咪达唑仑正常状态(记为0 min),A2、A3和A4按照18.0 mg/kg给予咪达唑仑后15、30、60 min进行血气分析。B部分40只,分为5组($n=8$):对照组(B1)单次腹腔注射生理盐水18.0 mg/kg,B2、B3、B4、B5分别单次腹腔注射咪达唑仑4.5、9.0、13.5、18.0 mg/kg。给予咪达唑仑6 h后进行多聚甲醛灌注,取脑,进行caspase-3免疫组织化学染色与图像分析。**结果** 咪达唑仑单次注射未发现幼龄SD大鼠产生缺血缺氧表现。单次给予咪达唑仑可导致幼龄SD大鼠大脑神经元caspase-3活化,给予较高剂量咪达唑仑后caspase-3活化强度明显增加。**结论** 咪达唑仑可以促发幼龄SD大鼠大脑神经元caspase-3活化,并可能导致大脑神经元凋亡。

关键词: 咪达唑仑;caspase-3活化;神经元;凋亡
中图法分类号: R329.25;R338.1;R971.2 **文献标识码:** A

Effect of Midazolam on caspase-3 activation of cerebral neurons in 7-day-old rats

WANG Guo-yi, TAO Guo-cai, YI Bin, CUI Jian (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Midazolam on caspase-3 activation of cortical neurons in rat brain. **Methods** The experiment consisted of part A and part B, including 64 7-day-old Sprague Dawley rats of either sex. In part A 24 rats were randomly divided into 4 groups according to the time point when the arterial blood was collected after intraperitoneal injection of 18.0 mg/kg Midazolam ($n=6$ in each group), group A1 without Midazolam treatment as control, group A2 (15 min), group A3 (30 min), group A4 (60 min). In part B, 40 rats were randomly divided into groups B2 – B5 ($n=8$ in each group) according to the dose of Midazolam (4.5, 9.0, 14.5, 18.0 mg/kg) and group B1 as control receiving 18.0 mg/kg normal saline. Both control and experimental rats were perfused transcardially with paraformaldehyde 6 h after Midazolam treatment, then their brains takenout were used for caspase-3 examination by immunohistochemistry. **Results** Single injection of Midazolam did not induce hypoxia/ischemia in 7-day-old SD rats, but led to the activation of caspase-3 in cerebral neurons. Furthermore, higher single dose of Midazolam enhanced the activation of caspase-3 more. **Conclusion** Midazolam triggers the activation of caspase-3 in cortical neurons and may lead to neuronal apoptosis.

Key words: Midazolam; caspase-3 activation; neuron; apoptosis

1989年Olney等[1]观察到MK-801、苯环利定、氯胺酮、替来他明4种N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体阻断剂类麻醉、镇静药,可导致成年大鼠脑皮层神经元病理性改变。此后又有研究表明,幼龄大鼠或小鼠接受NMDA受体阻断剂或(和)γ-氨基丁酸-A($GABA_A$)受体激动剂,可促发脑神经元广泛地退行性变[2-4]。人类脑发育的关键期从妊娠末3个月至出生后3岁前,胎儿和婴幼儿的神经系统处于发育的敏感期和高峰期,在此期间使用某些全身麻醉和镇静药,是否会引起中枢神经系统的损伤并影响成年后的认知功能,目前国内的研究报道较少,所观察的药物也较局限。咪达唑仑是一种属于$GABA_A$受体激动剂类的全身麻醉药。本研究拟观察咪达唑仑对新生大鼠脑神经元caspase-3活化的影响,为临床儿童麻醉和镇静的药物使用提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 药品

咪达唑仑(批号20060901,江苏恩华药业集团有限公司),

作者简介:王国毅,男,四川省成都市人,硕士研究生,医师,主要从事全身麻醉与认知功能相互关系方面的研究。电话:(023)65463270
通信作者:陶国才,电话:(023)68754197
收稿日期:2007-05-14;修回日期:2007-06-28

活性 caspase-3（Asp175）抗体（CST 公司，美国），生物素标记山羊抗兔 IgG S-P-9001 试剂盒（北京中杉生物技术有限公司），ABL 715 型血气分析仪（Radiometer 公司，丹麦），奥林巴斯 BX41 图像分析系统（奥林巴斯公司，日本）。

1.2 动物及分组

出生 7 d SD 大鼠 64 只，雌雄不拘，体质量 12～14 g，由第三军医大学实验动物中心提供。分为 A、B 2 部分。A 部分 24 只，分为 4 组（$n=6$）：A1 为未给予咪达唑仑正常状态（记为 0 min），A2、A3 和 A4 按照 18 mg/kg 给予咪达唑仑后 15、30、60 min 进行血气测量。B 部分 40 只，分为 5 组（$n=8$）：对照组（B1）单次腹腔注射生理盐水 18.0 mg/kg，B2、B3、B4、B5 组分别单次腹腔注射咪达唑仑 4.5、9.0、13.5、18.0 mg/kg。

1.3 血气分析

A 部分幼鼠 24 只，使用肝素化的 26G 皮下静脉留置针穿刺左心室，抽取动脉血，用 ABL 715 型血气分析仪行血气分析。采血后幼鼠行空气栓塞处死。

1.4 caspase-3 活化检测

B 部分幼鼠经腹腔单次注射咪达唑仑。注药后与母鼠分笼观察。母、幼鼠均置于 28 ℃室温中。6 h 后对幼鼠予 3% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉后开胸，经左心室至升主动脉插管，肝素生理盐水冲洗后，4% 多聚甲醛-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.4）灌注固定约 30 min。取脑入 4% 多聚甲醛-25% 蔗糖溶液（4 ℃）浸泡 6 h，冰冻切片机连续冠状 9 μm 切片并贴于防脱载玻片。0.01 mol/L TBS 漂洗后加入 3% H_2O_2-甲醇溶液，经 5% 牛血清白蛋白 25～28 ℃封闭 1 h，加入活性 caspase-3 抗体（1∶200，4 ℃）孵育 12 h，漂洗后加入生物素标记山羊抗兔 IgG（1∶100）25～28 ℃孵育 1 h，再经辣根酶标记链霉素卵白素工作液 37 ℃孵育 15 min。DAB 显色，苏木精复染色，经梯度脱水、封片后奥林巴斯 BX41 图像分析系统观察并采集图像，Image Pro Plus 软件进行分析。每只幼鼠选取 3 张切片，每张切片于 400 倍视野下记取大脑皮层 3 个视野中 caspase-3 阳性细胞数目，计算平均值；测量平均灰度值计算该幼鼠切片平均灰度值。

1.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 血气分析

与对照 A1 比较，A2、A3、A4 血气分析测量值之间差异均无统计学意义（$P>0.05$），见表 1。

表 1 A 部分各组幼龄大鼠单次注射咪达唑仑后动脉血气分析值（$\bar{x}\pm s$）

组别	时间点（min）	pH	$p(CO_2)$（mmHg）	$p(O_2)$（mmHg）	HCO_3^-（mmol/L）	SaO_2（%）
A1	0	7.46±0.05	30.6±5.9	93.1±16.2	23.3±5.1	92.5±2.9
A2	15	7.43±0.01	38.5±3.6	93.6±11.8	25.2±1.0	92.0±2.8
A3	30	7.43±0.03	37.0±6.7	92.7±16.9	25.1±3.9	91.6±4.6
A4	60	7.44±0.07	31.6±7.6	94.5±2.2	23.1±3.9	91.7±1.6

2.2 大脑皮层神经元 caspase-3 活化比较

2.2.1 caspase-3 阳性细胞计数 B2 组与对照组 B1 比较无统计学意义（$P>0.05$），而 B3、B4、B5 组较对照组 B1 有显著增加（$P<0.01$）。B3、B4、B5 组分别与各自上一浓度组比较，有显著增加（$P<0.01$）。见图 1。

2.2.2 灰度值 B2 组与对照组 B1 比较无统计学意义（$P>0.05$），而 B3、B4、B5 组较对照组 B1 有显著增加（$P<0.01$）。B3 组较 B2 组有增高（$P<0.01$），B4、B5 组分别与各自上一浓度组比较，有显著增加（$P<0.01$）。见表 2。

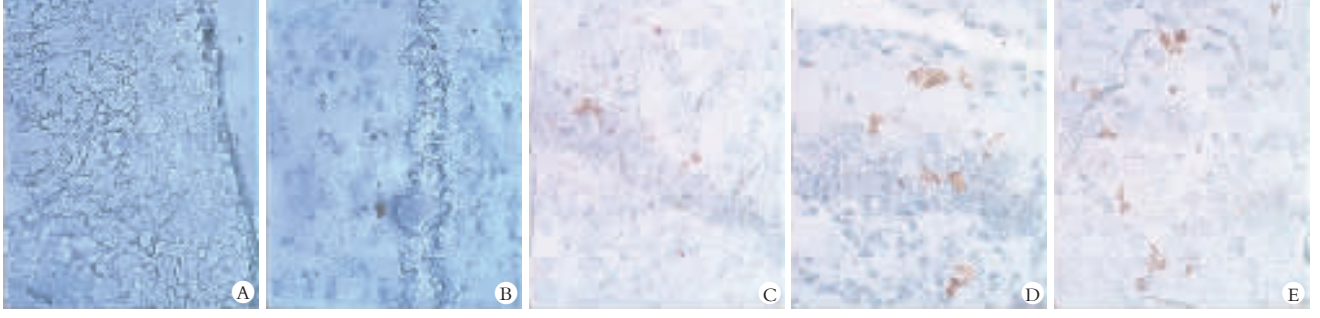
表 2 B 部分各组幼龄大鼠大脑皮层神经元 caspase-3 活化比较（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	caspase-3 阳性细胞	灰度值
B1	1.26±0.33	222.06±8.79
B2	1.67±0.22	216.01±6.74
B3	3.84 ± 0.32^{ab}	205.07 ± 5.73^{ab}
B4	5.98 ± 0.53^{ac}	185.19 ± 6.55^{ac}
B5	8.78 ± 0.60^{ad}	176.27 ± 6.73^{ad}

a：$P<0.01$，与 B1 组比较；b：$P<0.01$，与 B2 组比较；c：$P<0.01$，与 B3 组比较；d：$P<0.01$，与 B4 组比较

3 讨论

以前的研究已证实，既是 NMDA 受体阻断剂又是 $GABA_A$ 受体激动剂的乙醇，可促发新生儿中枢神经元



A：B1 组（×400）；B：B2 组（×400）；C：B3 组（×400）；D：B4 组（×400）；E：B5 组（×400）

图 1 7 d 幼龄大鼠大脑皮层神经元 caspase-3 免疫组织化学染色结果（S-P）

大批凋亡以及导致胎儿乙醇综合征(fetal alcohol syndrome, FAS)[2]。NMDA 受体阻断剂氯胺酮能引起新生 SD 大鼠海马神经元大量凋亡和突触素表达减少[3]。以上现象的发生机制目前还未得以阐明。$GABA_A$及其受体是人等哺乳动物中枢神经系统的重要神经递质及受体,参与中枢神经元发育、可塑性建立等,并和学习记忆等重要功能密切关联。在人类妊娠末至出生后 3 岁前的脑快速发育期,$GABA_A$受体处于过度敏感期,使表达 $GABA_A$受体的神经元对 $GABA_A$受体的活性过度敏感。Jevtovic-Todorovic 等[4]对出生7 d 大鼠给予咪唑安定/异氟醚/笑气复合麻醉 6 h,发现幼龄大鼠脑神经元退行性变和海马突触功能的降低,以及持续性的学习记忆能力的损害。Vutskits 等[5]在新生大鼠大脑室下区神经元离体实验中发现,临床相关浓度的异丙酚可引起神经元树突发育持续性受损。

本研究表明,咪达唑仑单次注射剂量 4.5 mg/kg 时,未发现有促进 7 d SD 幼鼠大脑皮层神经元 caspase-3 活化。剂量为 9.0 mg/kg 时,明显促进 7 d SD 幼鼠大脑皮层神经元 caspase-3 活化,并随着咪达唑仑剂量的增加,这种促进作用逐渐增强。属于 $GABA_A$受体激动剂类的咪达唑仑在临床麻醉浓度水平可以促发 SD 幼龄鼠的大脑皮层神经元 caspase-3 激活,随剂量增加这种激活效应增加明显,并可能导致脑神经元凋亡。

按照动物体质量、种属与人药物剂量换算公式[6],确定咪达唑仑单次腹腔注射剂量 9 mg/kg 相当于临床麻醉所使用剂量。在本实验中观察发现,7 d SD 幼鼠在此剂量翻正反射消失,达到临床麻醉深度。

单次腹腔注射咪达唑仑 18.0 mg/kg 后 15、30、60 min,SD 幼鼠血气分析值与未注射药物生理状态下血气分析值之间差异无统计学意义,可以排除注射咪达唑仑引起 SD 幼鼠缺血缺氧的可能性及其对脑神经元 caspase-3 活化的影响。

caspase-3 酶原在蛋白酶级联切割体系中处于核心地位,其激活后可导致多种细胞凋亡发生,不同的蛋白酶分别切割 caspase-3 酶原,从而激活 caspase-3。而其活化后又进一步切割不同底物,导致级联放大效应,其被认为是凋亡的最后通路,是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶。本研究所使用的活性 caspase-3 抗体(cleaved caspase-3 antibody),只识别被剪切后的活性 caspase-3 亚基,不识别全长的 caspase-3 和非活性亚基,具有高特异性和敏感性。本实验所研究的麻醉药物还比较单一,后续若能在包括凋亡相关基因转录、蛋白翻译等方面多层次研究,并增加所研究的麻醉和镇静药物种类,将会给临床新生儿和婴幼儿麻醉和镇静提供更多的基础研究资料。

大脑是全身麻醉药物的主要靶器官,处于突触发育期(synaptogenesis)的发育阶段大脑(developing brain)接受了 NMDA 受体阻断剂或 $GABA_A$受体激动剂之后,可触发大脑广泛的神经元凋亡[7]。2007 年美国食品与药品管理局已开始分析关于某些麻醉、镇静药导致幼年动物模型中枢神经系统病理性改变的资料,并将对包括氯胺酮、异丙酚、咪达唑仑、氟烃类等 20 余种麻醉药应用于新生儿和婴幼儿的安全性,作进一步的深入研究[8]。重新认识和研究麻醉和镇静药在儿科和产科的临床使用,对于指导临床麻醉、镇静用药具有重要价值。

综上所述,咪达唑仑可以促发幼龄 SD 大鼠短期内脑神经元 caspase-3 活化,并可能导致脑神经元凋亡,对脑神经元功能与结构的远期影响有待进一步研究。

参考文献:

[1] Olney J W, Labruyere J, Price M T. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs[J]. Science, 1989, 224(4910): 1360 - 1362.

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

[3] 陈志斌, 杨天德. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20): 2042 - 2044.

[4] Jevtovic-Todorovic V, Hartman R E, Izumi Y, *et al*. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits[J]. J Neurosci, 2003, 23(3): 876 - 882.

[5] Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, *et al*. Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter *in vitro* dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons[J]. Anesthesiology, 2005, 102(5): 970 - 976.

[6] 孙瑞元. 定量药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 363 - 370.

[7] Olney J W, Young C, Wozniak D F, *et al*. Anesthesia-induced Developmental neuroapoptosis. Does it happen in humans? [J]. Anesthesiology, 2004, 101(2): 273 - 275.

[8] Mellon R D, Simone A F, Rappaport B A. Use of anesthetic agents in neonates and young children[J]. Anesth Analg, 2007, 104(3): 509 - 520.

(编辑　薛国文)