DOI:10.16016/j.1000-5404.201409095

论著

异丙酚对发育期小鼠大脑皮质锥体细胞成熟和树突发育的影响

黄 静[1],景 胜[1],包晓航[1],柳 鹏[1],唐小童[2],杨振慧[2],赵敬会[2],杨天德[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院麻醉科[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨异丙酚对小鼠大脑皮质发育阶段神经元成熟和树突发育的影响。**方法** 选用同窝的发育期小鼠按随机数字表法分为3组:1%脂肪乳剂注射对照组,30 mg异丙酚注射组,60 mg异丙酚注射组。于出生后第7天(P7)经腹腔注射。采用免疫荧光方法检测异丙酚注射注射对P7小鼠大脑皮质内胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)免疫反应阳性的星形胶质细胞及NeuN免疫反应阳性的成熟神经元的变化,MAP2B免疫组化检测锥体细胞形态与数量的变化。运用高尔基染色观察异丙酚对P14小鼠大脑皮质内锥体细胞树突棘总数及亚型数量的变化。**结果** 不同剂量异丙酚对P7小鼠大脑皮质星形胶质细胞和成熟神经元细胞数量均无显著影响,MAP2B免疫组化显示60 mg异丙酚注射显著减低P7小鼠大脑皮质内锥体细胞的数量与树突总数,而30 mg异丙酚注射则无显著改变。高尔基染色结果进一步证实:与对照组比较,60 mg异丙酚注射显著减少P14小鼠大脑皮质锥体细胞树突棘总数($P<0.05$)及蘑菇样树突棘数量($P<0.05$);30 mg异丙酚注射亦显著减少蘑菇样树突棘数量($P<0.05$),而对树突棘总数的影响未达到统计学差异。**结论** 异丙酚单次注射对发育期小鼠大脑皮质成熟神经元及星形胶质细胞数量影响不明显,但高剂量注射对皮质锥体细胞树突的发育与树突棘的成熟有显著抑制作用。

[关键词] 异丙酚;成熟神经元;树突棘;皮质;发育
[中图法分类号] R322.81; R329.24; R971.2
[文献标志码] A

Effect of propofol on maturation and dendrite formation of pyramidal neuron in developing cerebral cortex of mice

Huang Jing[1], Jing Sheng[1], Bao Xiaohang[1], Liu Peng[1], Tang Xiaotong[2], Yang Zhenhui[2], Zhao Jinghui[2], Yang Tiande[1] ([1]Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Histology and Embryology, Chongqing Institute of Neurosciences, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of propofol on the maturation and dendritogenesis of neurons in the developing cerebral cortex. **Methods** Mice from the same litters were randomly divided into 3 groups with 6 rats in each group, that is, control group (1% intralipid), low-dosage propofol group (30 mg/kg propofol) and high-dosage propofol group (60 mg/kg propofol). The corresponding drugs were injected intra-peritoneally in 7 d after born (P7). In 1 h after the injection, immunofluorescence assay was used to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuronal nuclei (NEUN) in the cerebral cortex of mice, and microtubule-associated protein 2 B (MAP2B) was used to detect the changes in the morphology and the number of cortical pyramidal cells. In 7 d after the injection (P14), Golgi staining was further used to analyze the numbers of the total dendritic spines and its subtypes of cortical pyramidal

[通信作者] 杨天德,E-mail:31011@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150121.1025.001.html(2015-01-21)

cells. **Results** No significant difference was observed in GFAP-positive cells and NEUN-labeled cells in the cerebral cortex between mice treated with different dosage of propofol at P7. The MAP2B immunochemistry confirmed that the number of cortical pyramidal cells and its total dendrites were significantly lower in the high-dosage group than in control group at P7, while no significant difference was observed between the low-dosage group and control. Moreover, Golgi staining further demonstrated that the number of total dendritic spines of cortical pyramidal cells ($P<0.05$) and the number of mushroom-type spines ($P<0.05$) were significantly lower in the high-dosage group at P14 than the control. No significant difference was observed in the number of total dendritic spines while the number of mushroom-type spines was significant reduced ($P<0.05$) in low-dosage group compared with control group. **Conclusion** Single injection of propofol has no significant influence on the number of mature cortical neurons or astrocytes, but high-dosage propofol treatment can significantly reduce the dendritogenesis of cortical pyramidal cells and the mature of the dendritic spines.

[**Key words**] propofol; mature neurons; dendritic spines; cerebral cortex; development

Corresponding author: Yang Tiande, E-mail:31011@sina.com

异丙酚是目前运用最广的全麻药物之一,它诱导的全麻手术唤醒之后的一段时间内,患者会出现短时间的认知功能障碍。这种认知功能障碍主要表现为短期记忆的缺失,以及躁动不安、言语杂乱等,并且这种认知功能障碍在不同年龄的人中恢复时间不一,对年轻人恢复时间较短,小孩及老年人恢复时间较长。流行病学资料显示4岁以前婴幼儿多次使用全麻药可引起认知功能障碍。在大鼠中证实生后2周内多次使用异丙酚可引起神经元的凋亡,并导致成年期发生明显的认知功能障碍。进一步研究表明:在皮质突触形成的关键期即相当于小鼠生后2周使用全麻药减少突触的密度与神经环路的发育[1]。皮质锥体细胞树突的发育及树突棘的成熟度与突触的形成密切相关,而不同剂量异丙酚对于皮质锥体细胞树突的发育及树突棘的成熟度的影响尚少见相关报道。本实验将不同剂量的异丙酚腹腔注射入P7的发育期小鼠,通过免疫组化观察异丙酚对新生小鼠大脑皮质星形胶质细胞、成熟神经元及锥体细胞的影响;用高尔基染色进一步检测异丙酚对大脑皮质锥体细胞树突棘形态和数量的变化,明确异丙酚对发育期小鼠大脑皮质突触形成及环路调节的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、材料

异丙酚(propofol)购自AstraZenenca公司,批号:JP524;10%脂肪乳购自Fresenius Kabi公司,批号:10F13522。胶质纤维酸性蛋白(GFAP)购自北京中杉公司,神经元特异性核蛋白(NeuN)与微管相关蛋白2(MAP-2B)均购自Millipore公司;生物素化二抗和荧光二抗均购自Invitrogen公司,SABC购自Vector公司。高尔基染色试剂盒(FD Rapid Golgistain™ Kit Cat)购自FD Neuro TECHNOLOGIES公司。显色试剂盒DAB购自北京中杉公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物与分组 6只健康C57BL/6J孕鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,5月龄,体质量24~31 g),温度17~21 ℃,按自然昼夜节律采光,充足水和食物饲养。18只同窝的子鼠按随机数字表法分成3组($n=6$):对照组、30 mg异丙酚注射组和60 mg异丙酚注射组。

1.2.2 药物处理 小鼠出生当天记为P0。P7时对照组小鼠腹腔注射10%脂肪乳,30 mg异丙酚注射组小鼠腹腔注射异丙酚30 mg/kg(溶剂为10%脂肪乳),60 mg异丙酚注射组小鼠腹腔注射异丙酚60 mg/kg。药物注射1 h后每组各取3只小鼠断头取脑组织用于免疫荧光化学检测。剩余每组3只小鼠于药物注射7 d后分离脑组织用于高尔基染色。

1.2.3 免疫荧光化学及免疫组化染色 收集标本用新鲜的4%多聚甲醛固定13 h,转移到30%的蔗糖溶液,待其充分脱水后,莱卡冰冻切片机以25 μm切片,放入冻存液中于-20 ℃保存。选取合适的切片PBS漂洗后,0.3% Triton X-100在37 ℃放置30 min,1% BSA封闭液中反应1 h;分别与含有兔抗GFAP(1∶200)或鼠抗NeuN(1∶200)的一抗工作液孵育,室温反应2 h后4 ℃过夜。漂洗后加入荧光二抗(1∶200),37 ℃孵育2 h;经0.01 mol/L PBS漂洗3次,漂片,风干,荧光封片剂封片。选取合适的切片PBS漂洗后,切片3%的H_2O_2室温反应30 min,0.01 mol/L PBS漂洗3次;0.3% Triton X-100在37 ℃放置30 min,1% BSA封闭液中反应1 h后与含有鼠抗

MAP2B(1∶200)的一抗工作液孵育,室温反应 2 h 后 4 ℃ 过夜后加入生物素化二抗(1∶200),37 ℃孵育 2 h;0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,与 SABC 复合物 37 ℃孵育 1 h;漂洗后 DAB 显色,自然风干,中性树胶封片。阴性对照以 PBS 或 BSA 代替一抗,其他步骤相同。

1.2.4 高尔基染色 取 P14 小鼠大脑放入高尔基混合液(A 液 10 mL + B 液 10 mL)浸泡 2 周,常温,避光处理。换 C 液 4 ℃ 48 h。冰冻切片机以 80 μm 切片。贴片至半干状态时滴入 C 液,放置 2 h。避光显色后行树脂封片,油镜下观察树突棘形态及数量。

1.3 统计学分析

对照组、30 mg 组、60 mg 组小鼠各 3 只,每只选取大脑额叶皮质 5 张,在蔡氏显微镜 ×20 光镜下进行皮质区 GFAP 和 NeuN 免疫反应阳性细胞计数,并采用光密度分析法分析皮质区 MAP2B 的表达。锥体细胞树突棘计数方法:在蔡氏显微镜 ×100 光镜下计算大脑额叶皮质锥体细胞基数突长度为 20 μm 的树突棘总数与各型树突棘数目。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件,应用单因素方差分析及组间行多重比较。

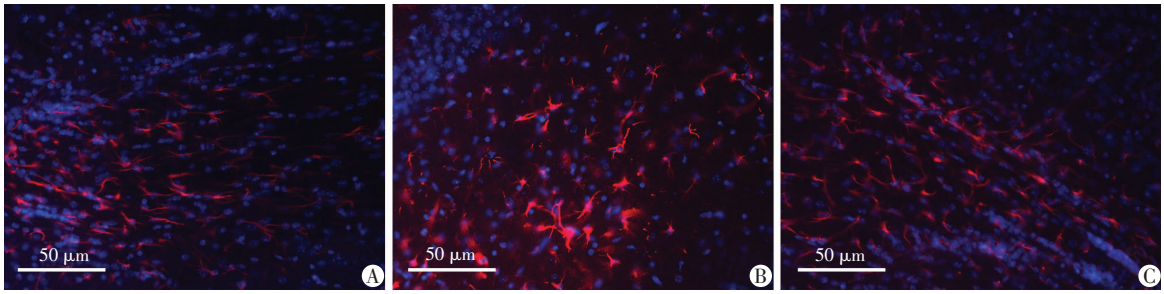
2 结果

2.1 异丙酚单次剂量注射对发育期小鼠大脑皮质星形胶质细胞数量的影响

采用 GFAP 标记星形胶质细胞,观察不同剂量的异丙酚对 P7 小鼠大脑皮质内星形胶质细胞的数量的影响。免疫组化结果显示:与对照组比较,注射不同剂量的异丙酚对 P7 小鼠大脑皮质内 GFAP 标记的星形胶质细胞数量无显著差异[对照组(49.88 ± 8.78) *vs* 30 mg 组(55.66 ± 14.97);对照组 *vs* 60 mg 组(50.00 ± 12.34),$P > 0.05$,图 1]。

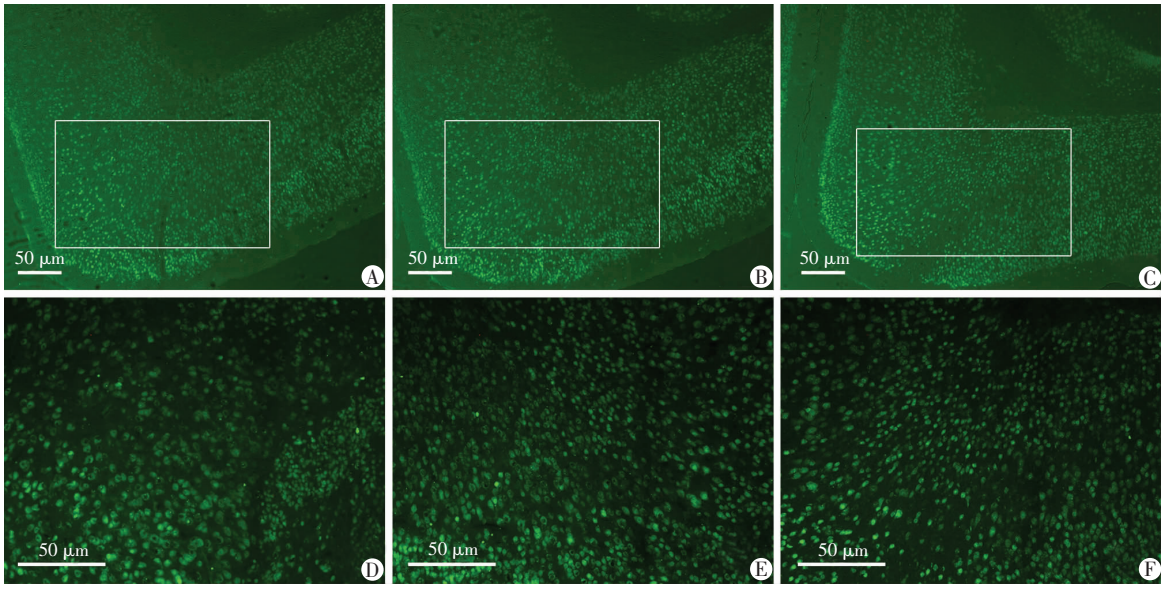
2.2 异丙酚单次剂量注射对发育期小鼠大脑皮质成熟神经元的影响

NeuN 为成熟神经元的标志,免疫组化结果显示:与对照组比较,腹腔注射 30 mg/kg 或 60 mg 异丙酚对 P7 小鼠大脑皮质内 NeuN 免疫反应阳性细胞计数[对照组(255.22 ± 67.04) *vs* 30 mg 组(270.56 ± 63.17);对照组 *vs* 60 mg 组(267.67 ± 82.08),$P > 0.05$,图 2]。提示异丙酚单次剂量注射对发育期小鼠大脑皮质神经元的成熟无显著影响。



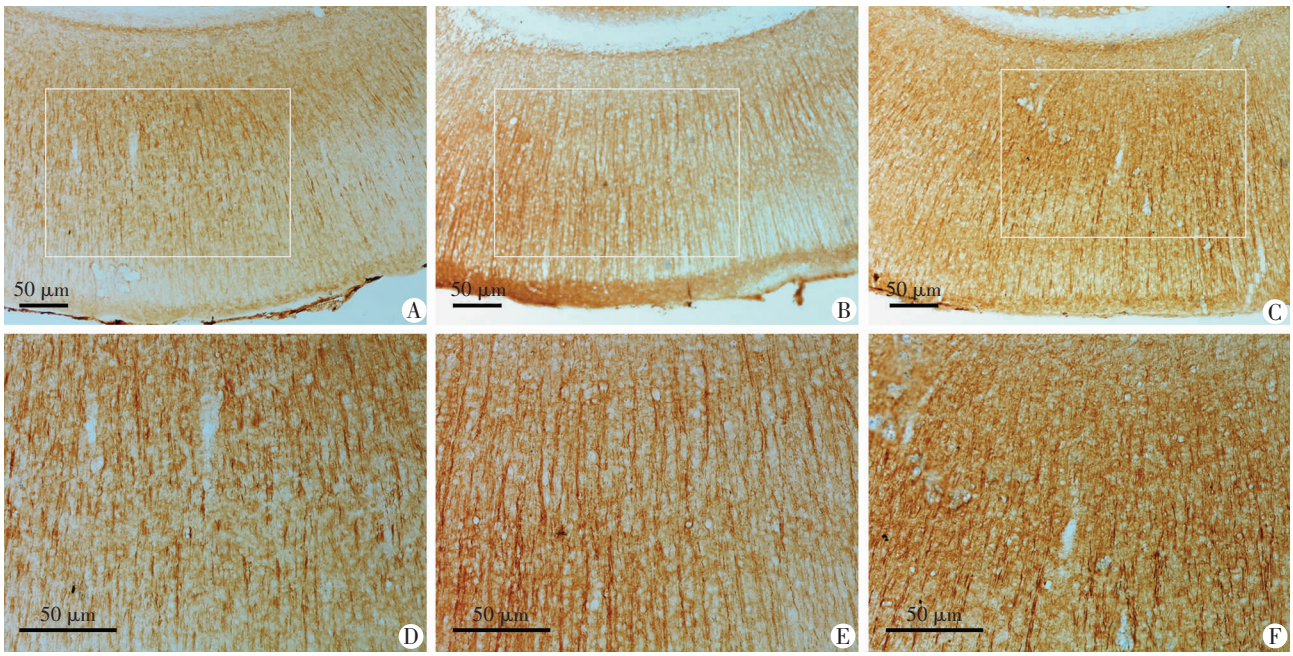
A:对照组;B:30 mg 异丙酚组;C:60 mg 异丙酚组

图 1 异丙酚对发育小鼠大脑皮质星形胶质细胞的影响 (免疫荧光标记法)



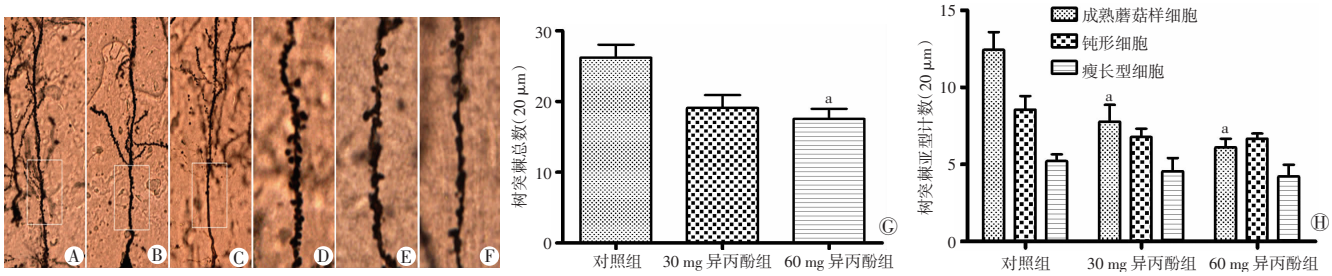
A、D:对照组;B、E:30 mg 异丙酚组;C、F:60 mg 异丙酚组;D ~ F:A ~ C 中方框的局部放大

图 2 异丙酚单次注射对发育期小鼠大脑皮质成熟神经元细胞数量的影响 (免疫荧光标记法)



A、D:对照组;B、E:30 mg 异丙酚组;C、F:60 mg 异丙酚组;D~F:A~C 中的局部放大

图3 异丙酚单次注射对发育期小鼠大脑皮质椎体细胞树突棘密度的影响 (SABC 染色)



A~F:高尔基染色观察小鼠大脑皮质内锥体细胞树突棘的形态;A、D:对照组;B、E:30 mg 异丙酚组;C、F:60 mg 异丙酚组;D~F:A~C(×40)中的局部放大图(×100);G:树突棘总数统计结果 a:$P<0.05$,与对照组比较;H:树突棘亚型统计结果 a:$P<0.05$,与对照组比较

图4 异丙酚单次注射对发育期小鼠大脑皮质椎体细胞树突棘突触总数及形态的影响

2.3 异丙酚单次剂量注射对发育期小鼠大脑皮质 MAP2B 表达的影响

MAP2B 微管相关蛋白主要存在于神经元的胞体和树突,可以特异性标记大脑皮质第Ⅱ/Ⅲ层或Ⅴ层的锥体细胞,并清楚显示锥体细胞的树突。采用光密度分析比较 MAP2B 的组间表达差异,发现腹腔注射 30 mg 异丙酚对 P7 小鼠大脑皮质内 MAP2B 的表达无显著影响[对照组(9.65±1.95) *vs* 30 mg 组(9.29±1.89),$P>0.05$],而腹腔注射 60 mg 则显著降低皮质内 MAP2B 的表达[对照组(9.65±1.95) *vs* 60 mg 组(7.54±2.53),$P<0.05$,图3]。

2.4 异丙酚单次剂量注射对发育期小鼠大脑皮质锥体细胞树突棘形态的影响

高尔基染色法可以清楚显示 P14 小鼠大脑皮质内锥体细胞树突棘的形态与分布。树突棘的形态一般分为蘑菇形、钝形和细长形 3 种亚型,其中蘑菇形为成熟形态,与记忆的形成相关;钝形为未成熟形态;细长形具有较强的可塑性与学习密切相关。高尔基染色结果显示:与对照组比较,腹腔注射 30 mg 异丙酚对皮质锥体细胞树突棘总数未达到显著性差异,而腹腔注射 60 mg 则显著减少锥体细胞树突棘总数($P<0.05$)。与此同时,腹腔注射 30 mg 或 60 mg 异丙酚均显著减少蘑菇形树突棘数量,与对照组比较均有显著性差异($P<0.05$);而不同剂量异丙酚对皮质锥体细胞钝型及细长型树突棘均无显著影响,与对照组比较均未达统计学差异。见图4。

3 讨论

大脑皮质的锥体神经元树突的分支状况对于皮质神经元的生理功能非常重要。对锥体神经元来说,顶

树突在接受传入信息的过程中起重要作用,基树突对反馈回路的形成有重要作用,而轴突则决定传出信息的范围和广度[2-4]。锥体细胞的树突棘是神经元树突上的功能性突起结构,亦是形成突触的部位,接受外界刺激,并将信号传入胞体[5]。因此锥体细胞的树突棘密度和树突棘的形态对神经细胞的信息传递起着非常重要的影响。有研究表明:海马CA1区锥体神经元的树突在生后第2~3周,发育最快,在此阶段其总长度、分支数目、最大分支级数等均随着发育明显增长[6]。在大脑皮质中证实小鼠生后2周使用全麻药减少突触的密度与神经环路的发育。本研究中我们发现单次注射异丙酚对发育期小鼠大脑皮质星形胶质细胞和成熟神经细胞虽无明显影响,但是60 mg异丙酚注射可显著减少锥体细胞的数量与树突总数,提示单次注射高剂量异丙酚可影响锥体细胞的树突发育。

在信息的传递过程中,树突棘通过改变自身的形状,使信息传递更加容易。细长型树突棘是动态的、不稳定的,具有很强的可塑性,为未成熟的;蘑菇形的树突棘是稳定的,成熟的,可以增强突触的连接,并具有记忆的功能[7-8]。通过对学习与树突棘数量之间关系的研究,发现空间学习、嗅觉学习等不同的学习方式对大鼠海马CA1区锥体神经元的基树突、顶树突的树突棘数量可能会产生不同的影响[9-10]。用高尔基染色进一步检测异丙酚对大脑皮质锥体细胞树突棘形态和数量的变化,我们发现单次注射30 mg异丙酚减少P14大脑皮质锥体细胞蘑菇形树突棘数量而对树突棘总数无显著影响;而60 mg异丙酚注射则显著减少蘑菇形树突棘数量与树突棘总数。因此,异丙酚可通过影响树突棘的数量与形态,进而影响突触之间的信息传递;且这一效应与异丙酚注射的剂量相关。

此外,树突棘形态可以随外界环境变化而产生相应的变化,这与受体或其他分子由胞浆向树突棘转运关系密切[11]。这亦提示异丙酚可通过一过性影响树突棘形态,而对的认知功能产生短暂的影响;随着异丙酚的代谢,树突棘形态的恢复,大脑认知功能的信息传递又得以恢复,认知功能也得以重新恢复正常。由此我们可以推测:异丙酚对发育期皮质锥体细胞树突及树突棘的调节可能是其影响大脑信息传递的一个方面,但其具体调节机制和方式还有待进一步的研究和证实。

参考文献:

[1] Yang G, Chang P C, Bekker A, *et al*. Transient effects of anesthetics on dendritic spines and filopodia in the living mouse cortex[J]. Anesthesiology, 2011, 115(4): 718-726.

[2] Gomez-Di-Cesare C M, Smith K L, Rice F L, *et al*. Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal neurons[J]. J Comp Neurol, 1997, 384(2): 165-180.

[3] Chevaleyre V, Moos F C, Desarmenien M G. Correlation between electrophysiological and morphological characteristics during maturation of rat supraoptic neurons[J]. Eur J Neurosci, 2001, 13(6): 1136-1146.

[4] 王殿仕, 李继硕. 新生大鼠海马CA1神经元突触反应和树突分枝的关系[J]. 中国神经科学杂志, 2002, 18(1): 400-404.

[5] Deller T, Korte M, Chabanis S, *et al*. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(18): 10494-10499.

[6] 王殿仕, 吕顺艳, 洪桢. 大鼠海马CA1区锥体神经元树突分支的生后发育[J]. 解剖学报, 2005, 36(1): 28-31.

[7] Bengtson C P, Freitag H E, Weislogel J M, *et al*. Nuclear calcium sensors reveal that repetition of trains of synaptic stimuli boosts nuclear calcium signaling in CA1 pyramidal neurons[J]. Biophys J, 2010, 99(12): 4066-4077.

[8] Marchetti C, Tafi E, Middei S, *et al*. Synaptic adaptations of CA1 pyramidal neurons induced by a highly effective combinational antidepressant therapy[J]. Biol Psychiatry, 2010, 67(2): 146-154.

[9] Leuner B, Falduto J, Shors T J. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus[J]. J Neurosci, 2003, 23(2): 659-665.

[10] Harms K J, Rioult-Pedotti M S, Carter D R, *et al*. Transient spine expansion and learning-induced plasticity in layer 1 primary motor cortex[J]. J Neurosci, 2008, 28(22): 5686-5690.

[11] Richards D A, De-Paola V, Caroni P, *et al*. AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus[J]. J Physiol, 2004, 558(Pt 2): 503-512.

(**收稿**:2014-09-15;**修回**:2014-11-15)

(编辑 王 红)