五味子酮保护大鼠皮层神经元对抗氯胺酮损伤的实验研究

张 明,蔡志平 ,赵志英 (内蒙古科技大学包头医学院人体解剖学教研室,内蒙古 包头 014040)

[摘 要] **目的** 研究五味子酮是否具有保护神经元免受氯胺酮损伤的作用。**方法** 原代培养的神经元分别加入不同浓度的氯胺酮、五味子酮后培养 24 h,观察神经元形态特征和检测神经元存活率。**结果** 神经元经不同浓度氯胺酮处理后胞体立体感消失,颜色变暗,细胞轮廓不清,较高浓度氯胺酮组神经元轴突断裂,部分死亡。与对照组比较随着氯胺酮剂量的增加神经元存活率逐渐下降($P<0.05$)。20 μmol/L 氯胺酮分别加入 30、50、70 μmol/L 五味子酮处理组神经元存活率明显高于 20 μmol/L 氯胺酮组($P<0.05$),且 70 μmol/L 五味子酮组神经元存活率高于其他两组($P<0.05$)。**结论** 氯胺酮具有损伤体外培养神经元的作用且成剂量依赖性,五味子酮具有保护神经元免受氯胺酮损伤的作用。

[关键词] 五味子酮;氯胺酮;皮层神经元;凋亡

[中图分类号] R338.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0266-02

Protective effect of schisandrone on ketamine-induced damage in cultured rat cortical neurons

ZHANG Ming, CAI Zhi-ping, ZHAO Zhi-ying (Department of Anatomy, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of schisandrone on ketamine-induced damage in cultured rat cortical neurons. **Methods** Primary cultured neurons were treated respectively by ketamine and schisandrone with different concentration for 24 hours. Neuron morphology was observed and neuron vitality was measured by MTT assay. **Results** Lack of three-dimensional sense, faded color, uncleared outline were observed in neurons treated by ketamine with different concentrations. Fractured neuron axons or neurons death were observed in neurons treated by high dosage of ketamine. The neuron surviving rate was decreased with the increase of ketamine dosage compared with the figures in the control group ($P<0.05$). The surviving rate of neurons treated by 20 μmol/L ketamine combined with 30, 50, 70 μmol/L schisandrone was higher than those treated by 20 μmol/L ketamine. The surviving rate of neurons treated by 70 μmol/L schisandrone was higher than that of the other two groups ($P<0.05$). **Conclusion** Ketamine can induce injury in cultured neurons in a dosage-dependent way and schisandrone has protective effect on ketamin induced neuron damage.

Keywords: schisandrone; ketamine; cortical neurons; apoptosis

五味子有效药物成份主要包括五味子酮(schisandrone)在内的木酯素类等[1]。五味子酮对脑微粒体脂质过氧化有抑制效应,对超氧阴离子具有清除作用,对处于活性氧应激状态下的细胞具有保护作用[2],能减轻神经元的损伤[3]。氯胺酮是常用麻醉药物,但研究发现氯胺酮具有神经毒性,这引起了人们的担忧[4]。氯胺酮是 NMDA 受体拮抗剂,而 NMDA 受体在神经系统的发育、突触形成等方面具有重要作用,并具有促进神经元存活的作用[5]。本研究旨在了解五味子酮是否具有保护神经元免受氯胺酮损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青),胰蛋白酶(上海华美生物工程公司),MTT、二甲基亚砜(Sigma),二氧化碳培养箱(Thermo),相差显微镜(XDB-1B),全自动酶标仪 ELX-800。

1.2 神经元原代培养

新生 1 ~ 3 d 的 SD 大鼠在无菌操作下迅速取出大脑,用 D-Hanks液清洗后取出大脑皮质,剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块,经 0.25% 胰蛋白酶 37 ℃消化数分钟,用培养基终止消化。然后经 100 目钢丝筛过滤,离心(1 000 r/min,10 min)后弃去上清,加入培养基制成细胞悬液。计数后按10^6/mL 的密度接种于经多聚赖氨酸处理的培养板中,37 ℃,5% CO_2 培养箱内培养。24 h 后全量换 B27 培养基无血清培养 5 ~ 6 d 后备用。

1.3 实验分组

氯胺酮对神经元量效作用检测分组:氯胺酮 10 μmol/L 组、20 μmol/L 组、30 μmol/L 组。五味子酮对神经元保护作用分组:空白对照组、五味子酮 50 μmol/L 组、氯胺酮 20 μmol/L 组、氯胺酮 20 μmol/L 加五味子酮 30 μmol/L 组、氯胺酮 20 μmol/L加五味子酮 50 μmol/L 组、氯胺酮 20 μmol/L 加五味

[作者简介] 张 明(1978 -),男,内蒙古包头市人,讲师,博士,主要从事应用解剖学研究。E-mail:asdxiaozhang@ sina. com

[收稿日期] 2011-12-24 [修回日期] 2012-02-24

子酮 70 μmol/L 组。

1.4 神经元活性检测

神经元活性检测采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法。用无酚红 DMEM 培养基调节神经元密度约每孔 2×10^4/接种于 96 孔板,24 h 后分别加入不同浓度的药物,每一浓度点设 3 个复孔,并设等量不含细胞的空白对照。24 h 后每孔加 5 mg/mL MTT 10 μl,培养 4 h,每孔加二甲基亚砜 100 μl,37 ℃孵育 3 min,酶标仪上测吸光度 A570 值作为神经元活性的参数。上述实验重复 3 次。细胞存活率的计算公式为:细胞存活率 = (实验组 A570 值 - 空白对照组 A570 值)/(对照组 A570 值 - 空白对照组 A570 值) × 100%。

1.5 数据处理

所有数据采用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 软件处理,组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

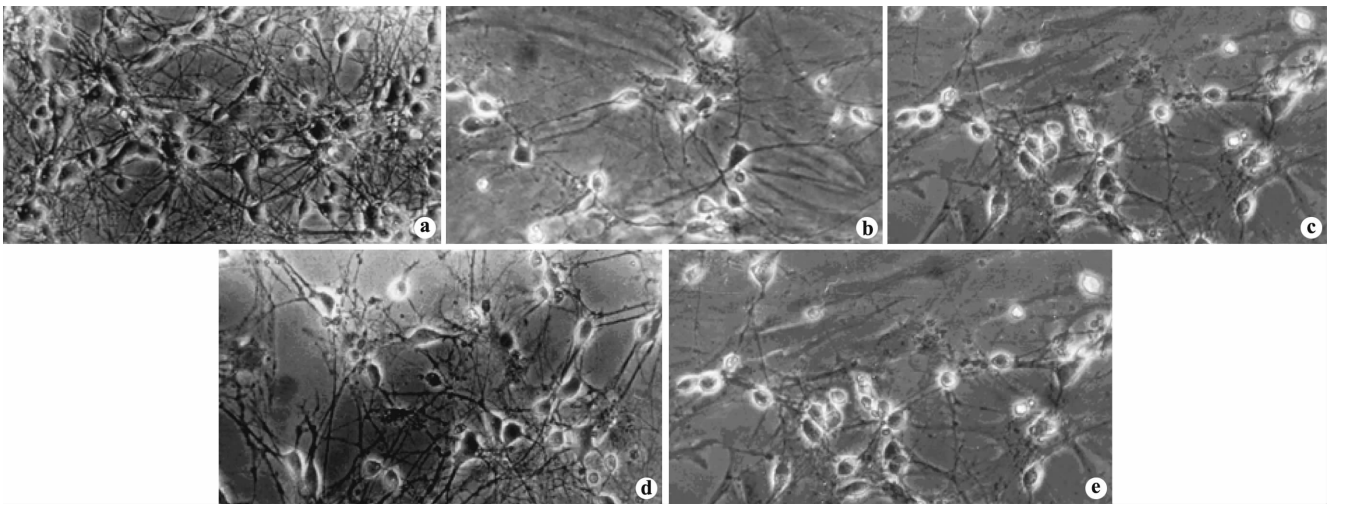
2.1 氯胺酮对神经元的影响

空白对照组神经元胞体丰满,突起较长,相互之间神经网络连接紧密。神经元经不同浓度氯胺酮处理后胞体立体感消失,颜色变暗,细胞轮廓不清,氯胺酮浓度较高组神经元轴突断裂,部分死亡(图 1)。各组神经元存活率见表 1。

表 1 不同浓度氯胺酮处理后神经元存活率($\bar{x}\pm s$, $n=4$, %)

组别	存活率
空白对照组	95.76 ± 1.38
氯胺酮 10μmol/L 组	86.13 ± 1.24 *
氯胺酮 20μmol/L 组	62.47 ± 2.95 *
氯胺酮 30μmol/L 组	33.90 ± 2.30 *

*:与空白对照组比较,$P<0.05$



a:空白对照组; b:氯胺酮 30 μmol/L 组; c:氯胺酮 20 μmol/L 加五味子酮 30 μmol/L 组; d:氯胺酮 20 μmol/加的五味子酮 50 μmol/L组; e:氯胺酮 20 μmol/L 加五味子酮 70 μmol/L 组

图 1 不同方法处理后神经元形态特征(×200)

2.2 五味子酮与氯胺酮共同对神经元的影响

神经元经 20 μmol/L 氯胺酮加 30、50、70 μmol/L 的五味子酮处理后神经元细胞形态,除 20 μmol/L 氯胺酮加 30 μmol/L 五味子酮组轴突断裂较多,胞体缩小变圆,小部分死亡外,其余两组形态基本正常(图 1)。加入五味子酮组神经元存活率明显高于氯胺酮单独处理组($P<0.05$),结果见表 2。

表 2 不同浓度五味子酮与氯胺酮共同处理神经元后神经元存活率($\bar{x}\pm s$, $n=4$, %)

组别	存活率
氯胺酮 20μmol/L 组	61.37 ± 2.11
空白对照组	92.95 ± 1.43 *
五味子酮 50μmol/L 组	90.85 ± 1.85 *
氯胺酮 20μmol/L 加五味子酮 30μmol/L 组	69.26 ± 1.76 #Δ
氯胺酮 20μmol/L 加五味子酮 50μmol/L 组	76.49 ± 2.01 *Δ
氯胺酮 20μmol/L 加五味子酮 70μmol/L 组	82.89 ± 1.90 *Δ

*:与 20 μmol/L 氯胺酮组比较,$P<0.01$;#:与 20 μmol/L 氯胺酮组比较,$P<0.05$;Δ:20 μmol/L 氯胺酮加 30、50、70 μmol/L 的五味子酮组组间比较,$P<0.05$

3 讨论

近年来研究发现氯胺酮对幼年动物具有较强的神经毒性,表现为大量神经元凋亡,幼年动物学习记忆能力明显下降。氯胺酮是 N-甲基-D-天(门)冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂,能导致凋亡神经元增多[5]。新生 7 d 小鼠皮下注射不同剂量氯胺酮后,在感觉运动皮质区

(下转第 270 页)

下降没有对照组明显。各时间点两组 $CD8^+$ 值组内或组间比较均无统计学意义。表明胃癌手术对患者有一定的应激作用,从而对免疫系统产生损害,而选择比较浅的麻醉深度对 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞有一定保护作用,有利于减少对免疫功能的损害。

[参考文献]

[1] 邢玉英,段晓丰,赵雪莲,等. 不同麻醉方法对肺癌根治术患者 T 细胞亚群及 IL-2、IFN-γ 的影[J]. 疑难病杂志,2010,9(3):171 – 173.

[2] 邢玉英,马艳辉,赵雪莲,等. 舒芬太尼、瑞芬太尼或芬太尼对食管癌根治术病人细胞免疫功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2008,28(11):972 – 975.

[3] 潘飞鹏,谢 健,杨 博,等. 异丙酚全凭静脉麻醉与异氟醚吸入麻醉对 T 细胞亚群和 NK 细胞的影响[J]. 中国现代实用医学杂志,2005,4(9):13 – 14.

[4] 马平康,杜 睿. 脑电双频指数监测(BIS)在临床麻醉中的应用研究[J]. 中国医药指南,2011,9(33):383 – 384.

[5] 叶颖江,王 杉. 胃癌免疫治疗的新进展[J]. 中华消化外科杂志,2010,9(4):247 – 249.

[6] 孙 巍,杨永辉,李登瑞,等. NKT 细胞、NK 细胞和 T 细胞亚群在活动性肺结核患者外周血的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(11):1030 – 1034.

[7] 洪超群,陈炯玉,杨卫平,等. 食管鳞癌患者手术前后外周血 T 细胞亚群与 NK、NKT 细胞检测的临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2010,18(6):1113 – 1115.

[8] Forestier F, Hirschi M, Rouget P, et al. Propofol and sufentanil titration with the bispectral index to provide anesthesia for coronary artery surgery [J]. Anesthesiology, 2003, 99(2): 334 – 346.

[9] Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids[J]. N Engl J Med, 1995, 332(25): 1685 – 1690.

[10] Seybold VS, Jia YP, Abrahams LG. Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation [J]. Pain, 2003, 105(1 – 2): 47 – 55.

[11] 游宏声. 瑞芬太尼复合丙泊酚静脉麻醉在无痛胃镜检查中的应用[J]. 局解手术学杂志,2008,17(2):82 – 83.

[12] 谢思明. 全麻复合硬膜外阻滞在开胸手术的应用效果分析[J]. 局解手术学杂志,2010,19(3):196 – 197.

(编辑:余汇洋)

(上接第 267 页)

和小脑出现呈剂量依赖性神经细胞变性凋亡[6]。NMDA 受体阻滞剂对成年个体也有神经毒性作用。研究发现多种 NMDA 受体阻滞剂均可导致神经元数量减少,该神经毒性可能有众多因子参与,包括干扰神经递质与 NMDA 和 GABA 受体的作用[7]。成年大鼠使用氯胺酮后,其脑切片可见到明显的病理改变[8]。有研究显示氯胺酮对老年个体具有更大神经毒性[9]。尽管机制仍不清楚,Sutton 等[10]研究认为 NMDA 拮抗剂引起细胞凋亡是通过激活 PI_3K/Akt 信号通路实现的。

我们研究发现神经元经过 10、20、30 μmol/L 氯胺酮处理 24 h 后存活率明显低于对照组,并且随着氯胺酮浓度增大神经元存活率逐渐降低,说明氯胺酮对培养的神经元有毒性作用。当分别用 20 μmol/L 氯胺酮和 30、50、70 μmol/L 的五味子酮处理神经元 24 h 后,神经元存活率明显高于 20 μmol/L 氯胺酮单独处理,五味子酮浓度越高与 20 μmol/L 氯胺酮单独处理的差异越显著,空白对照组与空白对照加五味子酮组相比较不存在显著性差异,说明五味子酮对体外培养的神经元细胞无毒害影响,且五味子酮对氯胺酮所致的神经元损伤有一定的保护作用,但是否是通过影响 PI_3K/Akt信号通路途径起作用,需进一步研究。

[参考文献]

[1] 李晓光, 高 勤, 翁 文, 等. 五味子有效部位及其药理作用研究进展[J]. 中药材,2005,28(2):156 – 159.

[2] Liu JH, Ho SC, Lai TH, et al. Protective effects of Chinese herbs on D-galactose-inducedoxidative damage[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2003, 25(6): 447 – 452.

[3] 贾丽艳,拓西平,朱嘉琦,等. 华中五昧子酮对阿尔茨海默病样大鼠海马内 IL-1β 及 iNOS 表达的影响[J]. 第二军医大学学报,2005,26(2):161 – 163.

[4] Hetman M, Kharebava G. Survival signaling pathways activated by NMDA receptors[J]. Curr Top Med Chem, 2006, 6(8): 787 – 799.

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

[6] Rudin M, Ben-Abraham R, Gazit V, et al. Single-dose ketamine administration induces apoptosis in neonatal mouse brain[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2005, 16(4): 231 – 243.

[7] Olney JW, Farber NB, Wozniak DF, et al. Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain[J]. Environ Health Perspect, 2000, 108(Suppl 3): 383 – 388.

[8] Jevtovic-Todorovic V, Benshoff N, Olney JW. Ketamine potentiates cerebrocortical damage induced by the common anaesthetic agent nitrous oxide in adult rats[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(7): 1692 – 1698.

[9] 何 焱,张 坤,陈东升,等. 不同剂量氯胺酮对其所诱发梦幻性质的影响[J]. 局解手术学杂志,2011,20(1):68 – 70.

[10] Sutton G, Chandler LJ. Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/Akt in cortical neuronal cultures[J]. J Neurochem, 2002, 82(5): 1097 – 1105.

(编辑:兰阳军)