基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0304-03

异丙酚对新生鼠海马神经细胞凋亡的影响

蒋 燕,李琪英,高 进,陈 萍
(重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究异丙酚对新生鼠海马神经细胞凋亡的影响。方法:新生 7 d SD 大鼠 42 只随机分为三组(n=14 只),雌雄各半:对照组(A 组)和异丙酚单次注射组(B 组)腹腔注射生理盐水 7.5 ml/kg,1 次 /d,连续 6 d;第 7 d 分别注射生理盐水 7.5 ml/kg 和异丙酚 75 mg/kg;异丙酚多次注射组(C 组)腹腔注射异丙酚 75 mg/kg,1 次 /d,连续 7 d。于第 7 d 给药后 3 h,各组抽取 2 只断尾取血测定血糖;给药后 5 h,各组随机抽取 6 只用免疫组化方法测定海马 CA1 区 caspase-3 表达水平。其余 6 只 3 周后处死,在光镜下观察海马 CA1 区锥体细胞的形态及缺失情况。结果:与对照组(A 组)比较,异丙酚单次注射组(B 组)和异丙酚多次注射组(C 组)caspase-3 表达均明显增高(P<0.05),海马 CA1 区单位面积锥体细胞不同程度减少(P<0.05),C 组较 B 组上述改变更为显著(P<0.05),且 C 组锥体细胞形态发生明显改变。结论:异丙酚可增加新生大鼠神经细胞凋亡,致使其幼年期锥体细胞减少,且反复多次注射后可引起幼年期锥体细胞形态改变。

【关键词】二异丙酚;受体;海马;凋亡
【中国图书分类法分类号】R971+.2 【文献标识码】A 【收稿时间】2008-06-06

Effects of propofol on pyramidal neuron apoptosis in hippocampus of neonatal rats

JIANG Yan, et al
(*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of propofol on pyramidal neuron apoptosis in hippocampus of neonatal rats. *Methods*: Forty-two seven-day-old male and female Sprague Dawley rats were randomly divided into three groups(n=14):group A received intraperitoneal 0.9% normal saline(7.5 ml/kg) once per day for seven days as control;group B received 0.9% normal saline(7.5 ml/kg)once per day for six days and propofol (75mg/kg)on the seventh day;group C received propofol (75 mg/kg) once per day for seven days. Two animals of each group were tested for blood glucose with tails cut off 3 hours after the last intraperitoneal injection,and six animals of each group were decapitated 5 hours after the last intraperitoneal injection for determination of caspase-3 expression with immuno-histochemistry. The other six animals of each group were decapitated after 3 weeks for microscopic examination. *Results*:Compared with group A, caspase-3 expression significantly increased while the number of pyramidal neurons decreased to different degree in both group B and C. More evident changes of the above were discovered in group C than that in group B,and the morphous of pyramidal neurons altered were only found in group C. *Conclusion*:The fact that increased caspase-3 expression leads to pyramidal neurons deletion to different degree was found in the rats which had received propofol.But the morphous of pyramidal neurons altered only when propofol had been repeatedly injected.

【Key words】Propofol;Receptor;Hippocampus;Apoptosis

已有研究表明,脑发育高峰时期,药物性阻断 N-甲基-D-天(门)冬氨酸(N-methyl-Daspartate, NMDA)受体或(和)过度激动 γ-氨基丁酸 A 型(γ-aminobutyric acid-A,$GABA_A$)受体会触发神经细胞凋亡[1]。$GABA_A$ 受体是静脉麻醉药异丙酚的重要作用靶点[2],直接或间接的抑制 NMDA 受体功能可能为麻醉作用最后的共同通路[3]。那么异丙酚是否会使发育脑组织神经细胞凋亡增加,从而导致神经网络结构破坏?本文拟观察单次和多次注射异丙酚对新生大鼠海马神经细胞凋亡的影响。

作者介绍:蒋 燕(1982-),女,硕士,
研究方向:心脑保护。
通讯作者:陈 萍,女,教授,E-mail:pingping620814@sina.com。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级新生 7 d SD 大鼠(重庆医科大学动物中心提供)42 只,12 ~ 16 g,雌雄各半。

1.1.2 药品与试剂 异丙酚(批号:ET763,AstraZeneca 公

司，意大利）；兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体（Lab Vision 公司，美国）；二抗试剂盒（ZYMED 公司，美国）；血糖分析仪（日本京都第一科学株式会社，日本）；GD-8 型病理影象多媒体图文操作系统（成都金盘电子科大多媒体技术有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立及分组 将大鼠随机分为 3 组：对照组（A 组）腹腔注入生理盐水 7.5 ml/kg，1 次 /d，连续 7 d；异丙酚单次注入组（B 组）腹腔注入生理盐水 7.5 ml/kg，1 次 /d，连续 6 d，第 7 天注入异丙酚 75 mg/kg 1 次；异丙酚多次注入组（C 组）腹腔注入异丙酚 75 mg/kg，1 次 /d，连续 7 d。麻醉后把新生大鼠放置于保温箱中，同时用婴儿脉搏血氧饱和度探头贴于鼠腹部，监测 SpO_2。于第 7 d 麻醉后 3 h，各组随机抽取 2 只断尾取血，用血糖分析仪测血糖；麻醉后 5 h 各组随机抽取 6 只，快速断头取脑，脑组织中后 1/3 处经冠状面切取约 2 mm 厚脑片置于 4% 多聚甲醛中固定，石蜡包块后以备免疫组化测定 caspase-3 表达水平。其余的与母鼠同窝饲养，自由进食饮水，于 21 日龄断母乳饲养。出生后 7 ~21 d，每天称体重。5 周龄时断头取脑组织，经 4% 多聚甲醛固定，Nissl 染色后光镜下观察脑组织病理改变。

1.2.2 caspase-3 表达的检测 采用免疫组化方法进行检测。大鼠脑组织石蜡切片常规脱蜡，100%、90%、80%、70% 系列酒精逐级水化各 3 min，自来水冲洗 3 min；枸橼酸盐抗原热修复 10 min，自然冷却至室温后，0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次，2 min/ 次；吸去切片周围多余的 PBS 液，每张切片滴加 30 μl H_2O_2，室温下孵育 10 min，0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次，2min/ 次；吸去 PBS 液，滴加正常山羊血清封闭液，室温孵育 10 min；吸去切片上多余液体，滴加兔抗鼠 Caspase-3 多克隆抗体（5 μg/ml），4℃孵育过夜；0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次，2 min/ 次；吸去 PBS 液，滴加生物素标记的二抗，37℃孵育 10 min；0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次，2 min/ 次；吸去 PBS 液，滴加 HRP 标记链亲和素，37℃孵育 10 min；0.01 mol/L PBS 冲洗 4 次，2 min/ 次；吸去 PBS 液，滴加新鲜配制的 DAB 显色液，反应 4 ~ 5 min，在显微镜下观察染色深浅，至适当程度终止反应，自来水冲洗；苏木素复染 3 ~ 4 min，自来水冲洗；1% 盐酸酒精分化，自来水冲洗，饱和碳酸锂转蓝，自来水冲洗；酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。光镜观察并拍照，胞浆成棕黄色颗粒为 caspase-3 表达阳性，用 GD-8 型病理影象多媒体图文操作系统进行图像分析，测定单位面积的阳性光密度值（OD）（重庆医科大学组胚教研室）。

1.2.3 脑组织病理改变 采用 Nissl 染色后光镜观察。脑组织经 4% 多聚甲醛液固定，石蜡包块切片后，二甲苯Ⅰ、Ⅱ依次脱蜡各 20 min，100%、90%、80%、70% 系列酒精逐级脱水各 3 min，流水冲洗 5 min，蒸馏水漂洗后，入 0.2% 甲苯胺蓝染色 4 h，90% 酒精分色数秒，100% 酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。光镜下观察海马组织 CA1 区锥体细胞形态及缺失情况并拍照。用 GD-8 型病理影象多媒体图文操作系统测定所选区域面积，并对该区域锥体细胞计数，计算出单位面积的锥体细胞数（个 /mm^2）。

1.3 统计学处理

用 sas8.2 软件分析，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析、秩和检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠一般情况

各组 SpO_2、血糖水平均在正常范围内，体重无明显差异。

2.2 脑组织 caspase-3 的表达

光镜下胞浆成棕黄色颗粒为 caspase-3 表达阳性，如图 1 所示，对照组（A 组）海马 CA1 区有少量 caspase-3 表达。与 A 组比较，B 组和 C 组的表达均有不同程度的增高（$P<0.01$），如图 2、3；C 组与 B 组比较，caspase-3 表达也明显增加（$P<0.01$），见表 1。

2.3 脑组织病理改变

在高倍显微镜下观察海马 CA1 区锥体细胞的形态改变。如图 4 所示，对照组（A 组）反映了正常幼年大鼠海马 CA1 区锥体细胞的排列结构及形态。与 A 组比较，异丙酚单次注射组（B 组）锥体细胞层结构较清楚，细胞形态无明显改变，胞浆呈蓝色，为 Nissl 体阳性反应，如图 5；而异丙酚多次注射组（C 组）细胞层结构紊乱，锥体细胞明显固缩，体积减小，细胞明显缺失，如图 6。海马 CA1 区神经细胞计数，与 A 组比较，B 组细胞数有所下降（$P<0.05$），C 组细胞明显减少（$P<0.05$）；C 组与 B 组比较，细胞也明显减少（$P<0.05$）见表 1。

3 讨 论

细胞凋亡是清除发育过程中形成的非正常神经细胞必需的方式，这保证了神经系统具有合理的结构。但病理性的细胞凋亡则会导致神经网络结构的破坏。半胱氨酸蛋白酶（Caspase）的激活被认为是细胞凋亡的特征性标志之一，caspase-3 为 Caspase 家族的成员，是所有细胞凋亡途径的最后效应子。研究表明，在脑发育高峰期，药物性阻断 NMDA 受体或（和）过度激动 GABA 受体都会增加神经细胞凋亡。大鼠脑发育高峰发生在出生后两周内，以神经系统发育成熟度为对照，出生 7 d 的大鼠相当于 36 周的胎儿[4]，故本实验选用出生 7 d 的大鼠作为研究对象并予以连续 7 d 的干预，此生命历程相当于脑发育高峰时期。鉴于全麻药在中枢神经系统可能的作用机理及未成熟脑组织对环境的易感性[5]，全麻药

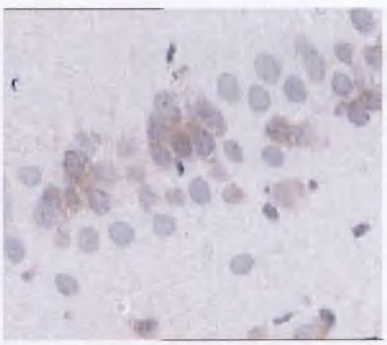


图 1 A 组海马 CA1 区 caspase-3 表达(×400)

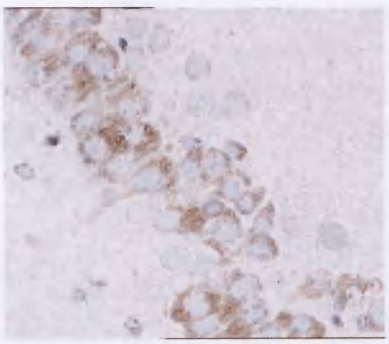


图 2 B 组海马 CA1 区 caspase-3 表达(×400)

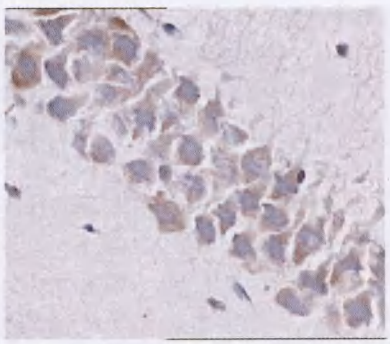


图 3 C 组海马 CA1 区 caspase-3 表达（×400）

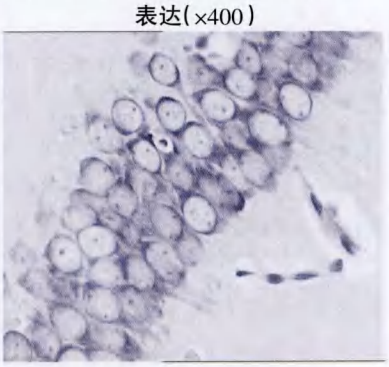


图 4 A 组光镜下海马 CA1 区病理学结果(Nissl 染色,×400)

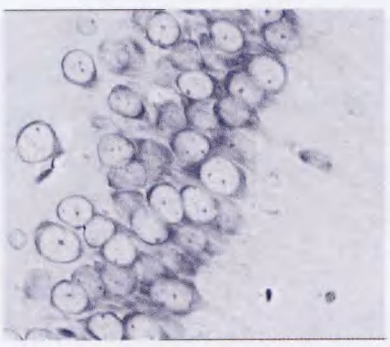


图 5 B 组光镜下海马 CA1 区病理学结果(Nissl 染色,×400)

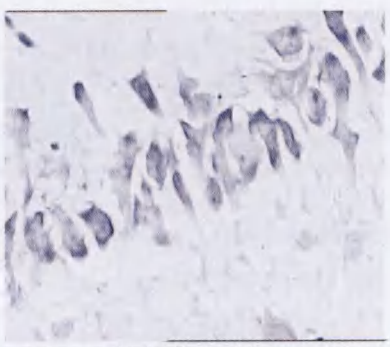


图 6 C 组光镜下海马 CA1 区病理学结果(Nissl 染色,×400)

表 1 各组海马 CA1 区 caspase-3 表达及锥体细胞数的比较(n=6,$\bar{x}\pm s$)

组别	caspase-3(光密度值)	锥体细胞数(个 /mm²)
A 组	0.018 6 ± 0.000 3	110.93 ± 4.87
B 组	0.042 7 ± 0.003 9*	101.11 ± 6.03☆
C 组	0.062 1 ± 0.0071*▲	49.05 ± 6.30☆△

注:与 A 组比较,☆P<0.05,*P<0.01;与 B 比较:△P<0.05,▲P<0.01

是否触发神经细胞凋亡？为此,国内外学者进行了初步的探索。研究发现,临床浓度的氯胺酮、咪达唑仑和异氟醚单一或复合用药均可使新生鼠脑组织 caspase-3 表达显著增高[6,7]。由于麻醉期间可能的低氧血症和低血糖会影响神经细胞的存活,故本实验采用对新生大鼠通气和循环影响较小的异丙酚麻醉剂量,麻醉期间监测 SpO_2 和血糖,排除了这些因素对实验结果的干扰。

本实验免疫组化结果显示,单次或多次注射异丙酚后 caspase-3 表达均明显增加,表明异丙酚会触发未成熟脑组织神经细胞凋亡。脑组织病理结果显示,单次注射异丙酚后海马 CA1 区锥体细胞有一定程度的减少,但细胞层结构仍较清楚,细胞形态无明显改变,而多次注射异丙酚后锥体细胞明显缺失,细胞层结构紊乱,细胞形态改变。我们推测,单次注射异丙酚后脑组织病理学改变较轻在一定程度上可能与病理性凋亡所致神经干细胞的激活、损伤修复有关,而内源性神经干细胞的增殖和分化是有限的,所以多次注射异丙酚反复引起细胞凋亡,会导致锥体细胞明显减少,细胞形态改变。Arvidsson 等[8]发现,NMDA 受体拮抗剂 MK-801 可以完全阻断缺血 2 h 引起的干细胞增殖,并认为这可能与抑制了某些生长因子的表达有关。也有报道,低浓度丙泊酚可促进体外培养海马神经前体细胞的增殖[9,10]。至于临床浓度异丙酚对神经干细胞的直接影响及神经干细胞对异丙酚所致细胞凋亡的增殖分化反应还有待进一步研究。

综上所述,异丙酚可增加未成熟脑组织神经细胞凋亡,致使大鼠幼年期锥体细胞缺失,且反复多次注射异丙酚后细胞形态可发生明显改变。

技术方法 文章编号:0253-3626(2009)01-0307-03

咪喹莫特诱导多品系小鼠脱毛动物模型的建立

杜 佳,赵恒光,李 惠
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究咪喹莫特外用建立多品系小鼠脱毛动物模型的可行性及其初步机理。方法:BARB/c、129、C3H/HeJ、C57 4 种品系小鼠各 30 只,各品系鼠均随机分成两组,实验组 4 组 *15 只,背部外用咪喹莫特每周 3 次;对照组 4 组 *15 只,外用不含药物的空白基质,随访一定时间后观察脱毛结果,并用免疫组化法检测毛囊周围 TLR7 受体的分布。结果:四种品系小鼠在给药 7 ~ 10 d 后均出现脱毛现象,形成斑片状脱毛区,成功率 100%。TLR7 受体在各品系小鼠的毛囊及其周围均有强阳性表达。结论:咪喹莫特外用能稳定地诱导 BARB/c、129、C3H/HeJ、C57 品系小鼠建立脱毛动物模型,是一种非疤痕性、非炎症性脱发,其机理可能与咪喹莫特诱导激活毛囊周围的 TLR7 受体有关。

【关键词】咪喹莫特;Toll 样受体 7;脱毛
【中国图书分类法分类号】R758.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-16

Establishment of alopecia animal model induced by imiquimod in multi-strain mice

DU Jia, et al
(Department of Dermoto-venereology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objectives*: To establish a novel alopecia animal model in multi-strain mice. *Methods*: BARB/c mice, 129 mice, C57mice and C3H/HeJ mice were purchased at the age of 6 to 8 weeks. 30 mice of each kind were divided into control and experimental groups randomly. The control group were treated with vehicle alone. The experimental groups were treated with imiquimod cream with cotton swaps for back skin 3 times a week. The existence of TLR7 on skin was examined by immunohistochemistry(IHC). *Results*: Alopecia lesions were observed in all the mice in experimental group, but mice in control group could not induce by imiquimod. The aggregation of TLR7 were observed in hair follicle. *Conclusions:* Imiquimod can stably induce non-inflammatory alopecia in BARB/c mice, 129 mice, C57mice and C3H/HeJ mice by activating TLR7.

【Key word】Imiquimod; Toll-like receptor 7; Alopecia

作者介绍:杜 佳(1983-),女,硕士,
研究方向:皮肤变态反应性疾病。
通讯作者:李 惠,女,教授,E-mail:lihui131128@vip.163.com。
基金项目:重庆市科委基金资助项目(2007BB5296)。

参 考 文 献

[1] Scallet A C, Schmued L C, Slikker W, et al. Developmental neurotoxicity of ketamine: Morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons[J]. Toxicological Sciences, 2004, 81(2):364-370.

[2] Kitamura A, Marszalec W, Yeh J Z, et al. Effects of halothane and propofol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(1):162-171.

[3] Irifune M, Takarada T, Shimizu Y, et al. Propofol-induced anesthesia in mice is mediated by γ-aminobutyric acid-A and excitatory amino acid recepors[J]. Anesth Analg, 2003, 97(2):424-429.

[4] Loepke A W, McCann J C, Dean Kurth C, et al. The physiologic effects of isoflurane anesthesia in neonatal mice[J]. Anesth Analg, 2006, 102(1):75-80.

[5] Ma D Q, Williamson P, Januszewski A, et al. Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain[J]. Anesthesiology, 2007, 106(4):746-753.

[6] Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin Y Q, et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain[J]. Br J Pharmacol, 2005, 146(2):189-197.

[7] 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.

[8] Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(1):10-18.

[9] 曹江北,张黎明,米卫东,等.丙泊酚对体外培养海马神经前体细胞增殖的影响[J].军医进修学院学报,2007,28(1):56-58.

[10] 王显望,杨天德,孙正清,等.异丙酚复合成低温对大鼠脑创伤后神经细胞凋亡的影响[J].重庆医学,2005,34(9):1363-1364.

(责任编辑:冉明会)