DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.030
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
1954 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)21-1954-03

异丙酚麻醉对大鼠中枢神经核团 *c-jun* 基因表达的影响

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 c-jun 基因的表达,了解异丙酚在大鼠中枢的可能作用位点。方法 42只Wistar大鼠随机分成6组:空白对照组(C组)、小剂量异丙酚组(50 mg/kg,P_1组)、中等剂量异丙酚组(100 mg/kg,P_2组)、大剂量异丙酚组(150 mg/kg,P_3组)、断尾刺激组(S_1组)、异丙酚作用后断尾刺激组(S_2组)。免疫组织化学法(ABC法)检测JUN核蛋白,统计各组大鼠脑片的JUN免疫反应阳性神经元的分布。结果 C组:JUN免疫反应阳性神经元散在分布在视上核、外侧隔核及外侧缰核等神经核团。P_1、P_2、P_3组:JUN免疫反应阳性神经元表达较对照组明显增多,主要分布在伏核、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,表达的阳性神经元数量与异丙酚剂量正相关。结论 异丙酚在大鼠中枢神经系统有与其静脉麻醉作用相关的神经核团。

关键词:异丙酚;中枢神经系统;*c-jun* 基因
中图法分类号:R322.81;R971.2 文献标识码:A

Nucleus distribution of the proto-oncogen *c-jun* in central nervous system of rats after anesthesia 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) by detection of the *c-jun* expression after propofol-induced anesthesia in rats. Methods Wistar rats were randomly divided into 6 groups: normal control (C), low-dose propofol group (50 mg/kg, P_1), middle-dose propofol group (100 mg/kg, P_2), high-dose propofol group (150 mg/kg, P_3), stimulation with tail broken group (S_1), and propofol + stimulation with tail broken group (S_2). The expressions of nucleoprotein JUN in the CNS were detected by immunohistochemisty. Results Rather weakly stained nucleoprotein JUN positive neurons were observed in the supraoptic nucleus, lateral septal nucleus, and lateral habenular nucleus in the control group. In groups P_1, P_2, and P_3, the expressions of nucleoprotein JUN were increased significantly as compared with those in the control group. The expressions were mainly located in the accumbent nucleus, lateral septal nucleus, periventricular hypothalamic nucleus, ventral lateral geniculalaten nucleus, dorsal lateral geniculate nucleus, supraoptic nucleus, suprachiasmatic nucleus, anteroventral preoptic nucleus, nucleus of the solitary tract, supramammillary nucleus, basolateral amygdaloid nucleus, paraventricular thalamic nucleus, lateral habenula nucleus, and islands of Calleja. The expressed positive neuron number was positively correlated with the doses of propofol. Conclusion Propofol anesthesia has the determined sites of action in rat CNS.

Key words: propofol; central nervous system; *c-jun*

静脉全身麻醉在中枢神经系统的作用部位至今仍不清楚[1]。研究即刻早期基因 *c-jun* 的诱导表达,可为中枢神经功能传导定位。本研究应用JUN核蛋白免疫组化法,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,为进一步探讨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

异丙酚纯品为阿斯利康公司产品。一抗为兔抗JUN IgG,二抗为生物素化抗兔IgG(即用型),三抗为生物素-亲合素-辣

作者简介:文欣荣(1973-),男,四川省广安市人,硕士,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
通信作者:陶国才,电话:(023)68754197
收稿日期:2004-05-06;修回日期:2004-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

根过氧化物酶复合物(即用型), DAB 显色液, 均为北京中山生物有限公司产品, Olympus 显微镜。

1.2　动物模型

Wistar 大鼠 42 只, 由第三军医大学实验动物中心提供。体质量约 150 g, 雌雄不拘, 用随机数字表法分为 6 组, 每组 7 只。分为空白对照组(C 组)、小剂量异丙酚组(50 mg/kg, P_1 组)、中等剂量异丙酚组(100 mg/kg, P_2 组)、大剂量异丙酚组(150 mg/kg, P_3 组)、断尾刺激组(S_1 组)、异丙酚作用后断尾刺激组(S_2 组)。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, 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。腹腔注射药物后观察各组大鼠呼吸、循环无明显变化。

1.3　免疫组织化学染色

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%庶糖(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, 然后依次入一抗(1∶500, 37 ℃ 4 h 后 4 ℃过夜), 二抗(即用型, 37 ℃ 4 h)和三抗(即用型, 37 ℃ 1 h), 最后用 DAB 显色液作呈色反应, 各步骤间均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次, 裱片, 晾干后经上行梯度酒精脱水, 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, 使用 SPSS10.0 软件行双因素方差分析。

2　结果

各组脑切片用 Olympus 显微镜观察, 显示 JUN 免疫反应(JUN-IR)阳性颗粒均匀分布于细胞核, 胞浆不着色。JUN-IR 弱阳性细胞核呈淡黄色, 中等度阳性细胞核呈棕黄色, 强阳性细胞核呈棕黑色, 脑内双侧对称性分布。阴性对照切片看不到免疫反应阳性细胞。神经核团的 JUN-IR 阳性神经元以每个核团内的数目来表示(表 1, 图 1～4)。

表 1　JUN 免疫反应阳性神经元在大鼠中枢神经系统的表达

Tab 1　JUN-IR expression in rat CNS

Nucleus	C	P_1	P_2	P_3	S_1	S_2
ACB	0	6.1±1.6★	10.2±2.6★#	18.8±6.7★#	0	10.3±2.3★
SuM	0	8.6±2.2★	12.5±2.3★#	19.6±4.6★#	0	11.2±6.6★
SCh	0	8.5±2.4★	15.2±2.8★#	19.5±3.1★#	0	11.1±2.5★
AVPO	0	8.3±2.6★	10.6±3.0★#	14.2±3.3★#	0	10.7±2.8★
Sol	0	6.5±1.3★	8.9±2.2★#	12.6±2.9★#	0	9.0±2.1★
DEn	0	5.7±1.8★	8.1±2.4★#	12.4±2.5★#	0	8.2±1.9★
VLG	0	7.6±2.2★	11.8±2.5★#	17.3±3.5★#	0	12.2±3.4★
Pe	0	7.8±2.0★	10.8±2.1★#	17.2±3.4★#	0	13.9±3.6★
Pir	6.4±0.5	9.5±3.1★	14.9±3.8★#	17.8±4.6★#	4.0±0.6★	13.2±3.8★
SO	5.3±0.9	9.4±3.8★	13.4±7.4★#	18.6±7.6★#	4.6±0.6★	13.4±7.0★
LS	4.3±0.6	8.5±2.6★	11.1±3.6★#	17.2±3.6★#	4.5±1.6★	11.2±3.8★
IHb	5.4±1.1	9.5±3.3★	14.1±3.8★#	19.4±4.6★#	31.4±7.7*△	30.6±7.9*△
Icj	0	5.6±2.5★	9.3±3.2★#	16.2±4.7★#	29.4±6.3*△	27.2±5.6*△
PV	0	6.8±2.2★	13.7±5.0★#	20.6±6.2★#	27.7±5.5*△	28.9±6.0*△
BL	0	6.5±2.9★	10.6±3.5★#	14.2±5.4★#	25.3±6.4*△	27.2±8.6*△

$F=16.66$, $P=0.000$; ★: $P<0.01$, *vs* C; △: $P<0.01$, *vs* P_2; #: $P<0.01$, *vs* P_1; *: $P<0.01$, *vs* P_3

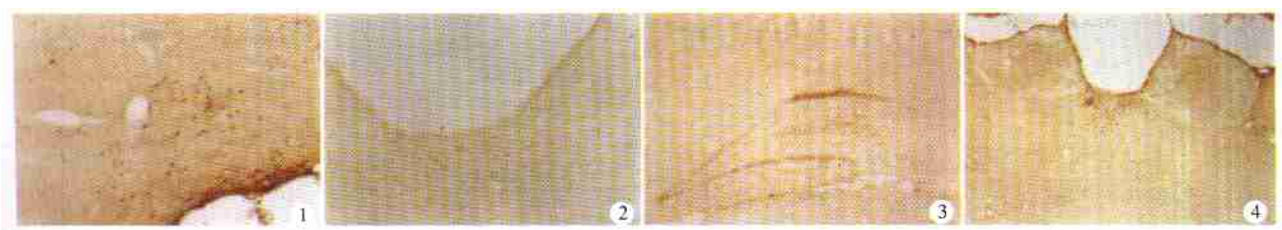


图 1　P_1 组 JUN 在大鼠中枢背外侧膝状核的表达　(ABC×100)

Fig 1　JUN expression within Den of the rat in group P_1　(ABC×100)

图 2　P_2 组 JUN 在大鼠中枢缰核的表达　(ABC×100)

Fig 2　JUN expression within LHB of the rat in group P_2　(ABC×100)

图 3　S_2 组 JUN 在大鼠中枢海巴的表达　(ABC×40)

Fig 3　JUN expression within Icj of the rat in group S_2　(ABC×40)

图 4　S_2 组 JUN 在大鼠中枢缰核的表达　(ABC×40)

Fig 4　JUN expression within LHB of the rat in group S_2　(ABC×40)

C 组大鼠中枢视上核(supraotic nucleus, SO)、外侧隔核(lateral septal nucleus, LS)及外侧缰核(lateral habenular nucleus, LHb)可见少量散在分布的 JUN-IR 阳性神经元。呈弱阳性表达, JUN-IR 阳性细胞核呈淡黄色。

P_1、P_2、P_3 组大鼠中枢 JUN-IR 阳性神经元较 C 组明显增多, 且呈强阳性表达, JUN-IR 阳性细胞核呈棕黑色, 主要分布在伏核(accumbens nucleus, ACB)、LS、下丘脑室旁核(periventericular hypothalamic nucleus, Pe)、膝状体腹下核(ventral lateral geniculalaten nucleus, VLG)、背外侧膝状核(dorsal endapiniform nucleus, Den)、SO、视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCh)、视前腹侧核

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(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)、LHb、海马回嗅觉小岛(islands of calleja, Icj)及乳头状核(supramammillary nucleus, SuM)等10余个核团,与C比较有非常显著差异($P<0.01$),且大鼠中枢JUN-IR阳性神经元表达与异丙酚剂量正相关,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ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol、BL、PV、LHb、Icj和SuM等核团可能为异丙酚在大鼠中枢的麻醉作用位点。

S_1、S_2组大鼠中枢JUN-IR阳性神经元呈强阳性表达,JUN-IR阳性细胞核呈棕黑色,较C组表达明显增多,S_1组主要分布在BL、PV、LHb及Icj等核团,S_2组主要分布在BL、PV、LHb、Icj以及Pir、ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol和SuM等核团。在BL、PV、LHb及Icj等核团S_1、S_2组表达的JUN-IR阳性神经元比较无显著差异($P>0.05$),但S_1、S_2分别与P_1、P_2、P_3比较均有非常显著差异($P<0.01$),提示BL、PV、LHb及Icj可能参与大鼠中枢对断尾刺激的反应。

3 讨论

近年来人们发现即刻早期基因 *c-jun* 可由于刺激等活动而立即进行转录,表达转译为JUN蛋白,作为转录因子调节其他靶基因,参与重要脑功能活动的信号转导和调控过程,是一种脑功能活动形态学定位标记物[2]。应用特异性抗体的原位免疫细胞化学方法探测JUN蛋白,已成为认识脑结构/功能的一个重要途径。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[3]。徐礼鲜等[4]曾报道用 *c-jun* 基因的表达研究静脉麻醉药硫喷妥钠在大鼠中枢的麻醉作用位点,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 *c-jun* 基因表达对研究麻醉作用位点的影响;并且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明显其他特殊效应,比较适合于全麻下 *c-jun* 基因表达的研究[5]。

JUN核蛋白作为即刻早期基因 *c-jun* 表达的产物,参与组成对其它靶基因转录调节的转录因子,被视为在外界刺激-转录偶联的信息传导过程中起着核内第三信使的作用,其表达可分为功能性刺激表达和伤害性刺激表达[6]。在功能性刺激表达中,JUN调控多细胞动物细胞间的公共关系,在长时程生理活动中发挥重要作用,本实验中P_1、P_2、P_3组的JUN可能为功能性表达,P_1、P_2、P_3组的 *c-jun* 基因在大鼠中枢Pir、ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol、BL、PV、LHb、Icj及SuM等核团表达与C组比较明显增多,且与异丙酚的剂量正相关,可能为异丙酚静脉麻醉时功能性表达,提示Pir、ACB、LS、Pe、VLG、DEn、SO、SCh、AVPO、Sol、BL、PV、LHb、Icj及SuM可能为异丙酚在大鼠中枢全身麻醉作用的位点。在伤害性刺激中JUN表达量与刺激强度、伤害程度、应激强弱等因素相关,其阳性核团可能为中枢参与应激反应主要作用位点,S_1、S_2组所加伤害性刺激,诱导JUN阳性细胞的表达与P_1、P_2、P_3组比较在PV、LHb、Icj及SuM等核团有显著性差异,目前研究表明PV、LHb、Icj及SuM等参与疼痛的传导、疼痛的情绪反应[7],提示疼痛刺激引起的c-jun基因表达部位具有与疼痛相关的神经核团分布规律性,进一步支持P_1、P_2、P_3组 *c-jun* 基因表达阳性核团可能为异丙酚在大鼠中枢全身麻醉作用的位点。

在研究方法上,由于 *c-jun* 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 *c-jun* 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JUN核蛋白的表达,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,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] Ting C H, Angel A, Linkens D A, *et al*. Neuronal network modelling of the effects of anaesthetic agents on somatosensory pathways[J]. Biol Cybern, 2003, 88(2): 99-107.

[2] 谢兴国, 蔡文琴, 张吉强, 等. 一氧化氮合酶阳性神经元在小鼠脑内的分布[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(1): 34-51.

[3] Forman S A, Miller K W, Yellen G. A discrete site for general anesthetics on a postsynaptic receptor[J]. Mol Phammacol, 1995, 48(4): 574-581.

[4] 徐礼鲜, 傅荣国, 张 惠, 等. 硫贲妥钠诱导c-fos基因在中枢神经系统的表达[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(3): 271-273.

[5] 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, 2001, 11(6): 671-677.

[6] Filipkowski R K, Inducing gene expression in barrel cortex-focus on immediate early genes[J]. Acta Neurobiol Exp Warsz, 2000, 60(3): 411-418.

[7] Frese A, Evers S. May A, Autonomic activation in experimental trigeminal pain[J]. Cephalalgia, 2003, 23(1): 67-68.

(编辑 栾 嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net