

· 实验研究 ·

复方氯胺酮口服液对大鼠海马 CA1 CA3 区 NMDA 受体 1 GABA_A 受体 mRNA 表达的影响

张锦¹, 陈华¹, 汪薇², 王娟娟³

(1. 中国医科大学附属第二医院麻醉科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国医科大学基础医学院设备处,
辽宁 沈阳 110001; 3. 东北电力医院麻醉科, 辽宁 沈阳 110015)

[摘要] 目的 通过观察小儿麻醉前用药复方氯胺酮口服液(CKOS)对大鼠海马 CA1、CA3 区的 γ -氨基丁酸 A 受体(GABA_AR)和氮-甲基-天冬氨酸受体 1(NMDAR₁)分布及其表达影响,探讨其镇静作用的机制。方法 选健康 SD 大鼠 50 只,随机分为 10 组,每组 5 只,分别在给药后 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360 min 处死。0 min 点为对照组,经灌胃器灌注 2 μ L/g 生理盐水,其它各组灌注 2 μ L/g CKOS。采用免疫组化和原位杂交技术检测各组 NMDAR₁、GABA_AR mRNA 在海马 CA1、CA3 区的表达和分布。结果 用药后海马 CA1、CA3 区的 GABA_AR mRNA 的表达逐渐增强,30~90 min 时受体表达最强,360 min 逐渐恢复用药前水平。NMDAR₁ 在 CA1、CA3 区表达呈抑制状态。结论 CKOS 能增强海马 CA1、CA3 区的 GABA_A 受体的 mRNA 表达和抑制 NMDAR₁ 的表达,从而产生镇静作用,最终达到消除恐惧的目的。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(4):345-348]

[关键词] 复方氯胺酮口服液; N-甲基-D-天冬氨酸受体₁; γ -氨基丁酸 A 受体; 海马; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)04-0345-04

Effects of compound ketamine oral solution on the expression of NMDA receptor 1 and GABA_A receptor mRNA in CA1 and CA3 regions of hippocampus in rats

Jin ZHANG, Hua CHEN, Wei WANG, Juan-Juan WANG. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: jinzhang_cmu2h@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective This study examined the effects of compound ketamine oral solution (CKOS) on the expression of NMDAR₁ and GABA_AR mRNA in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus in rats in order to investigate the mechanism of sedation for this medicine. **Methods** Fifty Sprague-Dawley rats were randomly assigned into ten groups according to the observed time after CKOS administration (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240 and 360 minutes, $n=5$ each). The 0 minute group (Control group) received normal saline instead. Immune histochemistry staining and in situ hybridization were used to determine the expression and the distribution of NMDAR₁ and GABA_AR mRNA in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus in various groups. **Results** The expressions of GABA_AR mRNA in the CA1 and CA3 regions of hippocampus were gradually increased after CKOS administration, with a significantly higher levels compared with those in the Control group at 30 and 90 minutes after administration. At 360 minutes the expression resumed to the similar levels to the Control group. The expressions of NMDAR₁ in the CA1 and CA3 regions of hippocampus were inhibited after CKOS administration, and were significantly lower compared with those in the Control group at each observed time point. **Conclusions** CKOS may increase the GABA_AR mRNA expression and inhibit the NMDAR₁ expression in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus in rats, which may be the underlying mechanism of sedation for this medicine.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(4):345-348]

Key words: Compound ketamine oral solution; NMDA receptor 1; Receptors, GABA-A; Hippocampus; Rats

麻醉前用药的主要目的是充分镇静、产生遗忘,消除小儿术前恐惧心理。海马是中枢神经系统调节行为和情绪的关键部位,分布着与情绪有关的重要的神经递质与受体,其中最主要是与兴奋性有关的

谷氨酸神经递质和 N-甲基-D-天冬氨酸受体₁ (N-methyl-D-aspartate receptor₁, NMDAR₁) 及其与抑制性有关的 γ -氨基丁酸 A 受体 (gamma-aminobutyric acid A receptors, GABA_AR)。由于传统的麻醉前用

[收稿日期] 2004-08-26; [修回日期] 2005-01-07

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20022074)。

[作者简介] 张锦(1957-),女,医学博士,硕士研究生导师,副教授,主攻方向:小儿麻醉。

药达不到术前充分镇静目的,造成小儿术前哭闹、挣扎和术后身心健康的损害^[1~4]。应用复方氯胺酮(Compound ketamine oral solution, CKOS)口服液后,能使小儿清醒镇静、合作、静脉穿刺无挣扎,解除了小儿术前恐惧^[5,6],但应用该剂型后的镇静机制尚未见报道,本研究通过观察 CKOS 对 SD 大鼠海马 CA1、CA3 区的 NMDAR₁、GABA_A 受体分布及其表达影响,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及标本采集

雄性健康 SD 大鼠 50 只,体重 150 ~ 200 g,随机分为 10 组,每组 5 只,分别于给药后 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360 min 10 个时间点处死。实验前 12 h 禁食、不禁水。0 min 点为对照组,经灌胃器灌注 2 μ L/g 生理盐水于胃内,其它各组将 CKOS 2 μ L/g [1 mL 含氯胺酮(Ketamine, KET) 50 mg、咪达唑仑(Midazolam, MZ) 5 mg、阿托品(Atropine, AT) 3 mg] 灌入胃内。分别在灌药后的相应时点观察鼠的镇静情况和对疼痛刺激的反应^[4],之后断颈处死,常规生理盐水及 4% 多聚甲醛灌注后取海马组织,置 4% 多聚甲醛中 2 h 后置 30% 蔗糖溶液沉底,制成厚 30 μ m 的冰冻切片。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂 NMDAR₁ 抗体(美国 CHEMICON);免疫组化染色试剂盒(北京中山);原位杂交试剂盒, GABA_A 抗体(武汉博士德); GABA_A 的寡核苷酸探针序列: 5'-GTCTG AAACG GGTCC GAAAC TGGTG ACGAA-3'; 5'-GGCAT GGTCA TGT-TG TGGGC CACTG ACTTC-3'; 5'-CTGTT TGTCC AAGAA GGTCA TACTG GTTTA-3'。

1.2.2 仪器 CM1800 Leica 冰冻切片机(德国); U-MCB Olympus 图象采集系统, O-PP10 摄像镜头(日本); BX60 Olympus 万能显微镜照相机(日本); METAMORPH/COOL SNAP + X/AX70 显微(荧光)图象分析系统(VIC/ROPER/OLYMPUS) US/JP; 药理、生理刺激仪(中国)

1.3 免疫组化

根据免疫组化试剂盒说明书进行 NMDAR₁ 免疫组化操作。

1.4 原位杂交

常规脱水、浸蜡、包埋,制作石蜡切片,厚度 6 ~ 8 μ m; 常规脱蜡; 按原位杂交试剂盒说明书进行 GABA_A 受体 mRNA 原位杂交操作。

1.5 显微照相及图像分析

应用 U-MCB Olympus 图象采集系统, O-PP10 摄像镜头, METAMORPH/COOL SNAP + X/AX70 显微(荧光)图象分析系统(VIC/ROPER/OLYMPUS)对图像进行分析处理。每张切片取 1 个视野, 高倍镜($\times 400$)下对受体的数量、染色灰度值进行统计学分析。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 11.5 进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较以方差分析、两组间比较用 t 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 CKOS 对 SD 大鼠海马 CA1、CA3 区 GABA_A R mRNA 的影响

GABA_A R mRNA 表达的多少与平均灰度值的高低成负相关, 灰度值愈高, 证明受体表达愈少。对照组 GABA_A R mRNA 在 CA1 区和 CA3 区表达很少; 用药后海马 CA1、CA3 区的 GABA_A R mRNA 的表达逐渐增强, 30 ~ 90 min 时受体表达最强, 360 min 恢复用药前水平(表 1、图 1)。

表 1 不同组海马 CA1、CA3 区 GABA_A R mRNA 表达平均灰度值的变化 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	CA1 区	CA3 区
0 min	120 $\pm$ 5	114 $\pm$ 5
5 min	117 $\pm$ 5	112 $\pm$ 5
10 min	117 $\pm$ 5	112 $\pm$ 5
15 min	114 $\pm$ 7	109 $\pm$ 5 ^a
30 min	110 $\pm$ 6 ^a	106 $\pm$ 7 ^a
60 min	111 $\pm$ 6 ^a	108 $\pm$ 6 ^a
90 min	111 $\pm$ 4 ^a	109 $\pm$ 6 ^a
120 min	114 $\pm$ 6	113 $\pm$ 7
240 min	115 $\pm$ 7	113 $\pm$ 5
360 min	119 $\pm$ 7	115 $\pm$ 6
<i>F</i>	2.58	9.16
<i>P</i>	0.02	0.00

a 与 0 min 组比较, $P < 0.05$

2.2 CKOS 对 SD 大鼠海马 CA1、CA3 区 NMDAR₁ 表达的影响

CKOS 对 SD 大鼠海马 CA1、CA3 区 NMDAR₁ 表达的影响见表 2、图 2。免疫组化结果显示, NMDAR₁ 在海马 CA1 区、CA3 区对照组的平均灰度值低于 5 ~ 120 min 各时间点, 240 min 之后平均灰度值减低, 说明 NMDAR₁ 在 0 min 时的表达明显优于其它各时点, 随着药效发挥 NMDAR₁ 表达受抑制, 120 min 后受体表达逐渐恢复, 但仍低于给药前水平。

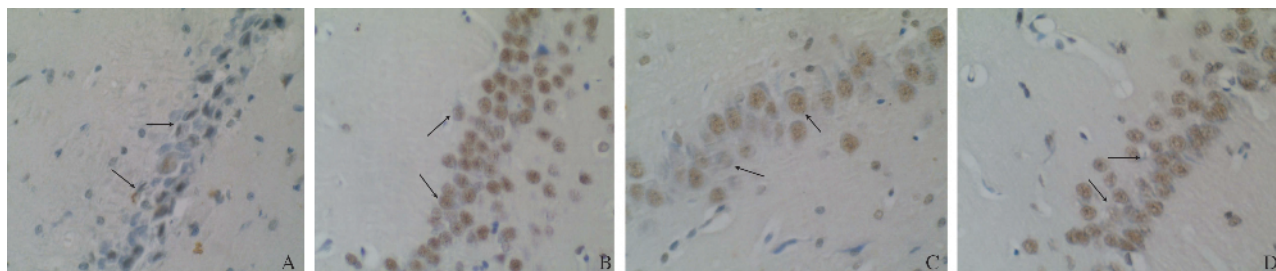


图1 复方氯胺酮口服液对海马 CA1 CA3 区 GABA_AR mRNA 表达的影响(原位杂交, ×400)

用药后 30 min 海马 CA1(B)、CA3 区(D), GABA_AR mRNA 表达较对照组(A;CA1;B;CA3)明显增强。

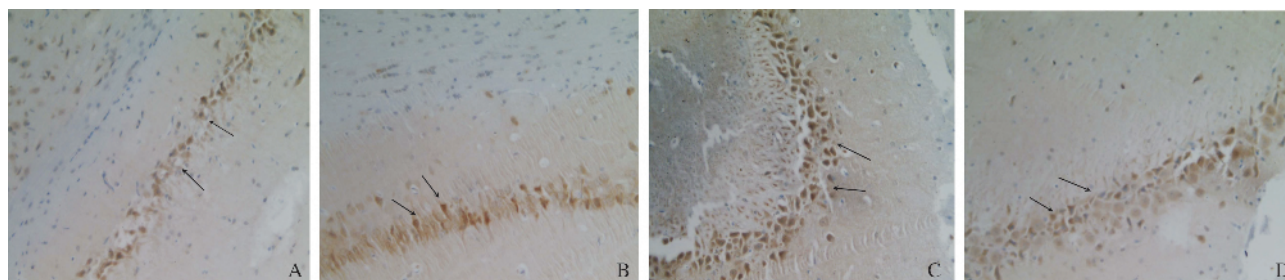


图2 复方氯胺酮口服液对海马 CA1、CA3 区 NMDAR₁ 表达的影响(免疫组化, ×100)

用药后 30 min 海马 CA1(B)、CA3(D)区 NMDAR₁ 表达较对照组(A;CA1;C;CA3)明显减弱。

表2 不同时点海马 CA1、CA3 区 NMDAR₁ 表达

平均灰度值的变化

($n = 5, \bar{x} \pm s$)

分组	CA1 区 NMDAR ₁	CA3 区 NMDAR ₁
0 min	104.9 ± 1.5	103.1 ± 2.1
5 min	108.6 ± 1.1 ^b	108.7 ± 0.8 ^b
10 min	108.8 ± 0.4 ^b	109.4 ± 1.9 ^b
15 min	108.8 ± 0.9 ^b	110.2 ± 1.2 ^b
30 min	108.1 ± 1.5 ^b	116.0 ± 4.5 ^b
60 min	108.8 ± 0.7 ^b	114.1 ± 3.0 ^b
90 min	107.9 ± 0.8 ^b	113.5 ± 2.4 ^b
120 min	107.6 ± 0.8 ^a	110.3 ± 2.3 ^a
F	9.07	10.37
P	0.00	0.00

a 与 0 min 组比较, $P < 0.05$; b 与 0 min 组比较, $P < 0.001$

3 讨论

海马是调节行为和情绪的关键部位,正常时海马的长时程增强主要依赖兴奋性氨基酸的释放和 NMDA 受体的激活,增加 Ca^{2+} 进入突触后神经元;谷氨酸同时激活代谢性谷氨酸受体,促使储存 Ca^{2+} 释放;突触后膜细胞 Ca^{2+} 浓度增加启动突触连锁反应,激活许多 Ca^{2+} 依赖酶的活性;最终导致突触后膜过度兴奋,结果突触后膜磷酸化并改变膜蛋白的表达包括兴奋性受体表达增加; Ca^{2+} 释放增加,促使一氧化氮作用突触前膜释放谷氨酸,维持着机体正

常兴奋状态^[5]。恐惧时,周身处于应激状态,特别是中枢神经系统分泌兴奋性氨基酸-谷氨酸增加,与 NMDA 受体结合增多。本实验结果显示,大鼠受刺激后,未用麻醉前用药的大鼠海马 CA1 区、CA3 区 NMDAR₁ 表达明显强于其它各点。用 CKOS 后 5 min,受体表达开始减弱,并随着药效的衰减 NMDAR₁ 表达逐渐恢复;其消除恐惧的作用机制可能为 CKOS 的主要成分之一氯胺酮是 NMDA 受体的拮抗剂,NMDA 受体是离子型谷氨酸受体的一种亚型,参与突触的形成和突触可塑性。NMDAR₁ 是通道的必需组份,当 NMDAR₁ 被阻断后, Ca^{2+} 不能进入细胞内,可以使谷氨酸的释放减少,降低与 NMDAR₁ 的结合,产生镇静作用。 Ca^{2+} 不能进入细胞内,细胞内 Ca^{2+} 恢复正常浓度,线粒体的功能也恢复正常,线粒体复合物电子传递链活性提高,ATP 产生增多,使细胞的功能恢复正常,免受损害。在中枢神经系统内的神经元、星形胶质细胞上存在依赖于 Ca^{2+} 或钙调蛋白的一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS),其主要激动剂是 NMDA 等,能快速短暂的生成一氧化氮(Nitric Oxide, NO),NMDAR₁ 被阻断以后,细胞内 Ca^{2+} 减少,依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白的 NOS 不能被激动,NO 的产生减少,减轻了 NO 诱导的谷氨酸的释放,海马 CA3 区兴奋性降低,达到镇静目的^[7,8]。

本实验结果显示,大鼠用药后 GABA_AR mRNA

表达明显高于用药前,并随着药效发挥, $GABA_A$ mRNA 表达逐渐增强,360 min 时仍有表达。这是因为 CKOS 的另一个主要成分咪唑达仑为苯二氮受体的激动剂,咪唑达仑通过与 $GABA_A$ 受体上的配体 BZ 位点结合,可增加氯离子通道开放频率,从而增强 GABA 的受体结合效应。现已发现 GABA 受体分 $GABA_A$ 、 $GABA_B$ 、 $GABA_C$ 、 $GABA_D$ 4 种亚型, $GABA_A$ 受体被激活后产生快速型抑制性突触后电位^[9]。许多研究表明, $GABA_A$ 受体与氯通道耦联形成的复合物是哺乳动物脑内重要的抑制性神经递质受体^[9]。电生理研究进一步证实,苯二氮草类可增强 $GABA_A$ 受体调控的抑制性突触电活动^[10],一方面通过直接增强 $GABA_A$ 受体介导的氯离子电流,另一方面显著增强氯离子通道平均开放时间或开放频率而增强氯电流并产生镇静效应。咪唑达仑等增强 GABA 诱发的电流,使 GABA 浓度反应曲线平行左移,半数有效剂量减小,而不改变诱发的最大电流,说明咪唑达仑是受体正性变构调节剂,其作用是增强 GABA 与受体的亲和力来消除恐惧^[11]。

综上所述,CKOS 可能是通过阻断兴奋性受体 MNDAR1 和加强抑制性受体 $GABA_A$ mRNA 的表达产生协同镇静、消除恐惧的作用。

[参 考 文 献]

[1] 张莉,张锦,任素杰,欧阳茹丽,韩盛,张红. 手术前后小儿及家

- 长心理调查分析及麻醉前用药途径的选择[J]. 中国医科大学学报,2003,32(1):62-64.
- [2] McGraw T. Preparing children for the operating room; psychological issues [J]. Can J Anaesth,1994,41(11): 1094-1103.
- [3] 韩盛,张锦,丁平田,崔健君,张秉钧. 口服术前药对大鼠神经行为的影响 [J]. 中华麻醉学杂志,2002,22(11):686-687.
- [4] 张锦,李妍,张福会,丁平田,张勇,崔建君,等. 不同剂量复方氯胺酮口服液对鼠重要脏器超微结构的影响 [J]. 中国医科大学学报,2003,32(5):390-393.
- [5] Funk W, Jakob W, Riedl T, Taeger K. Oral preanaesthetic medication for children; double-blind randomized study of a combination of midazolam and ketamine vs midazolam or ketamine alone [J]. Br J Anaesth, 2000, 84(3): 335-340.
- [6] 张锦,韩盛,丁平田,崔健君,张秉钧. 复方氯胺酮口服液用于小儿术前的药效观察 [J]. 中华麻醉学杂志,2003,23(6):412-415.
- [7] 朱长连,王小阳. MK-801 对新生大鼠脑缺氧缺血后 Caspase-3 激活及其对凋亡的影响 [J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(3):236-238.
- [8] Hudspeth MJ. Glutamate; a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury [J]. Br J Anaesth, 1997, 78(6): 731-747.
- [9] Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, et al. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors; classification on the basis of subunit structure and receptor function [J]. Pharmacol Rev, 1998, 50(2): 291-313.
- [10] Tanelian DL, Kosek P, Mody I, MacIver MB. The role of the GABAA receptor/chloride channel complex in anesthesia [J]. Anesthesiology, 1993, 78(4): 757-776.
- [11] 薛荣亮,付荣国,徐礼鲜. 咪唑安定对鼠中枢杏仁核神经元电活动的影响 [J]. 临床麻醉学杂志,2001,17(6):322-323.

(本文编辑:王霞)

· 消息 ·

全国第六届儿童发育和临床学术研讨会暨 儿童早期综合发展学习班通知

中国优生优育协会儿童发育专业委员会于 2006 年 4 月中旬在河南省郑州市召开全国第六届儿童发育利临床学术研讨会,该会将中请国家级继续教育项目。会间特邀美国哈佛大学儿童医院遗传实验室主任吴柏林教授做基因组医学和儿童发育的专题讲演,并请国内著名专家做专题报告,内容:1. 出生缺陷和遗传咨询(黄尚志);2. 婴幼儿情感发育和健全人格培养(孟昭兰);3. 幼儿人格趋向量表的应用(郑毅);4. 婴幼儿气质和抚育(杨玉凤);5. 婴幼儿营养和有关问题(苏宜香);6. 婴幼儿口腔健康与母婴保健(郑树国);7. 婴幼儿大脑发育和代偿性(李葆明);8. HIE 诊断和治疗的有关问题(邵肖梅);9. 儿童生长障碍的诊断和治疗(鲍秀兰);10. 小儿脑瘫防治论坛。投稿以论文、综述、工作总结和经验体会形式均可,寄全文和 400 字以内摘要各一份。截稿日期为 2006 年 2 月 28 日。稿件寄至北京月坛南街 1 号首都儿科研究所专家门诊部鲍秀兰、孙淑英收,邮编 100045。