

论著 · 实验研究

氯胺酮合用盐酸戊乙奎醚对新生大鼠突触素表达的影响

林蕾 张良成 郭永正

(福建医科大学附属协和医院麻醉科,福建 福州 350001)

【摘要】 目的 观察氯胺酮合用盐酸戊乙奎醚对新生大鼠学习记忆和海马 CA3 区突触素表达的影响。方法 7 d 龄 Sprague-Dawly 大鼠 80 只,随机分为 4 组,分别腹腔注射氯胺酮 50 mg/kg(K 组),盐酸戊乙奎醚 2 mg/kg(P 组),氯胺酮 50 mg/kg + 盐酸戊乙奎醚 2 mg/kg(PK 组)及与 PK 组相同容积的生理盐水(NS 组)。于给药后 14 d 行 Morris 水迷宫训练;给药后 24 h、14 d(水迷宫训练前)和 28 d(水迷宫训练后)行免疫组化测定海马 CA3 区突触素的表达。结果 ①水迷宫训练合格率以 NS 组和 P 组最高,PK 组最低;②给药后 24 h 突触素表达以 NS 最高,依次为 P 组、K 组及 PK 组($P < 0.05$);给药后 14 d 时各组大鼠突触素表达均有增加,但 NS 组和 P 组较快,K 组和 PK 组较慢($P < 0.05$);给药后 28 d 时各组大鼠突触素表达差异无显著意义($P > 0.05$)。结论 氯胺酮与盐酸戊乙奎醚合用比单用氯胺酮更能抑制新生大鼠空间学习记忆能力和海马 CA3 区突触素的表达,单用盐酸戊乙奎醚无显著影响。随着年龄的增长以及适当的学习训练,突触素表达可增加至正常水平。

[中国当代儿科杂志,2010,12(1):51-55]

【关键词】 氯胺酮;盐酸戊乙奎醚;学习记忆;突触素;新生大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2010)01-0051-05

Effect of ketamine combined with penehyclidine hydrochloride on the expression of synaptophysin in the brain of neonatal rats

LIN Lei, ZHANG Liang-Cheng, GUO Yong-Zheng. Department of Anesthesiology, Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China (Zhang L-C, Email: sunny0077@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of ketamine combined with penehyclidine hydrochloride on the learning and memory abilities and the expression of synaptophysin in the hippocampus CA3 region in the brain of neonatal rats. **Methods** Eighty seven-day-old Sprague-Dawly rats were randomly intraperitoneally injected with 50 mg/kg of ketamine (K group), 2 mg/kg of penehyclidine hydrochloride (P group), 50 mg/kg of ketamine plus 2 mg/kg penehyclidine hydrochloride (PK group) or normal saline (control group). The rats were trained and tested in a Morris water maze 14 days after administration. The immunohistochemical method was used to ascertain the expression of synaptophysin in the hippocampus CA3 region 24 hrs, 14 days and 28 days after administration. **Results** In the Morris water maze training, the rats in the PK group performed worst, followed by the K group. The rats from the P and NS groups performed well. Compared with the NS group, the expression of synaptophysin in the K and the PK groups decreased significantly 24 hrs and 14 days after administration ($P < 0.05$). The PK group had lower synaptophysin expression than the K group 24 hrs and 14 days after administration ($P < 0.05$). Up to 28 days after administration, the synaptophysin expression increased in all of the four groups and there were no significant differences between groups. **Conclusions** Ketamine combined with penehyclidine hydrochloride may inhibit more significantly learning and memory abilities and the synaptophysin expression in the hippocampus CA3 region than ketamine alone in neonatal rats. Penehyclidine hydrochloride alone has no effect on learning and memory abilities and the synaptophysin expression. The synaptophysin expression may increase to a normal level by training and with increasing age.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (1):51-55]

Key words: Ketamine; Penehyclidine hydrochloride; Learning and memory; Synaptophysin; Neonatal rats

围术期麻醉用药是否影响发育期大脑的学习记忆功能一直为人们所关注。现已知学习记忆与 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)、脑内胆碱(M 型、N 型)等递质及其受体密切相关^[1-2]。临床麻醉中,氯胺酮是婴幼儿常用的静脉麻醉药,其麻醉作用主要与非特异性地阻断 NMDA 受体功能有关;此外,在临床

[收稿日期]2009-07-02;[修回日期]2009-09-01
[作者简介]林蕾,女,本科,住院医师。
[通信作者]张良成,主任医师。

麻醉剂量下能够显著抑制神经元烟碱受体功能。盐酸戊乙奎醚系我国自主研发的新型选择性抗胆碱药,对外周毒蕈碱(M)受体主要作用于M1、M3亚型,而对外周M2受体的作用不明显,也不阻断神经突触前膜M2受体调控神经末梢释放乙酰胆碱(Ach)的功能;同时对N1、N2受体也有一定阻断作用。临床上氯胺酮与盐酸戊乙奎醚常常术前合用,是因为氯胺酮能使唾液和呼吸道分泌物增加,同时使心率增快;而盐酸戊乙奎醚作为抗胆碱药,既能拮抗氯胺酮增加唾液和呼吸道分泌的作用,又不明显加快心率^[3]。有研究报道单独大剂量或连续长时间腹腔注射氯胺酮会影响新生大鼠学习记忆功能的发育^[4-6],同时亦有报道老年患者术前使用盐酸戊乙奎醚术后出现谵妄^[7-9]。鉴于二者单独使用均可能引起记忆损害,故联合使用是否会加重记忆损害?国内有学者发现,氯胺酮与盐酸戊乙奎醚联合使用对成年小鼠记忆的抑制呈协同作用,但不超过4 d^[10]。两药合用对发育期鼠脑学习记忆功能的影响国内未见报道。本研究拟观察新生大鼠联合使用氯胺酮和盐酸戊乙奎醚后空间辨别学习能力和海马突触素表达的变化,为麻醉药的合理应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

7 d龄Sprague-Dawley (SD)大鼠80只,体重18~20 g。随机分成4组,即①氯胺酮组(K组, $n=20$),予以氯胺酮50 mg/kg腹腔注射;②盐酸戊乙奎醚组(P组, $n=20$),予以盐酸戊乙奎醚2 mg/kg腹腔注射;③氯胺酮+盐酸戊乙奎醚组(PK组, $n=20$),予以氯胺酮50 mg/kg和盐酸戊乙奎醚2 mg/kg联合腹腔注射。以上3组药物均以生理盐水稀释成0.1 mL/g容积;④生理盐水组(NS组, $n=20$),以等量体积的生理盐水腹腔注射。氯胺酮产自江苏恒瑞医药有限公司(批号080504),盐酸戊乙奎醚产自成都力思特制药有限公司(批号080309-1)。接受氯胺酮腹腔注射的新生大鼠用药后以婴儿脉搏血氧饱和度探头贴于腹部,监测脉搏血氧饱和度(SpO_2)与心率(HR),以防止麻醉过深导致脑缺氧缺血。新生大鼠给药后与母鼠同窝饲养。

1.2 Morris水迷宫训练

每组大鼠各10只于给药后14 d进行水迷宫训练。水迷宫是一直径120 cm,高50 cm的黑色水槽,等分为I、II、III及IV象限,在III象限中央距边缘

30 cm处放一透明站台,迷宫上方安置带有显示系统的摄像机,同步记录大鼠运动轨迹。迷宫外参照物不变,水深25 cm,水温恒定(25 ± 1)℃,平台在第3个训练日淹入水面下1 cm。每个训练日结束后清洗泳路侧壁以消除嗅觉提示。在每一个训练日,每只大鼠被连续训练10次。即由起点处(第I象限的侧壁中点)将大鼠放入水中,游至终点经平台出水为止。每次记录潜伏期,即由入水到开始游动的时间;运行时间,即由起点游到终点的时间;错误的次数,即改变游泳方向或进入盲端的次数。然后计算平均潜伏期、平均运行时间、正确率(正确数/训练次数)。最后以平均潜伏期小于5 s,平均运行时间小于15 s,正确率大于90%作为标准,判定是否建立了空间辨别性学习记忆^[11,12]。水迷宫训练7 d后按照标准筛选训练合格的大鼠,继续巩固训练7 d,即总计训练14 d。

1.3 突触素免疫组化测定

分别于给药后24 h、14 d(水迷宫训练前)和给药后28 d(水迷宫训练后)每组随机抽取5只大鼠,快速断头取脑后置于4%多聚甲醛中(4℃,pH 7.4)固定24 h,沿中脑前1/3切取厚约3 mm的脑片,再放入4%多聚甲醛液(4℃,pH 7.4)固定48~72 h。将固定后的脑片经0.01 mol/L磷酸盐生理盐水缓冲液(磷酸盐缓冲盐水PBS,pH 7.4)充分漂洗,以滤纸吸取残留液后行酒精脱水、二甲苯透明,石蜡包埋组织块。每一蜡块连续切10张脑片取一张,共取5张,片厚4 μm。切片经二甲苯脱蜡、0.01 mol/L PBS漂洗后,高压修复2 min(修复液:0.1 mol/L柠檬酸9 mL+0.1 mol/L柠檬酸钠41 mL+双蒸水450 mL),然后室温下每张切片分别滴入50 μL 3%过氧化氢水溶液(封闭内源性过氧化物酶)及50 μL的5%鸡蛋清(抑制非特异性IgG的结合)各30 min,之后加入小鼠抗大鼠多克隆突触素抗体(美国Sigma公司),4℃过夜后再加入山羊抗小鼠IgG抗体-HRP多聚体(北京中杉公司)37℃ 30 min。以上各步骤之间均以0.01 mol/L PBS充分漂洗。最后加新鲜配制的DAB溶液,显微镜下观察显色反应,适时终止。常规脱水透明、中性树胶封片。

将切片置于OLYMPUS显微镜下,放大400倍,采用Tiger2000图象分析系统测定海马CA3区的始层、辐射层和腔隙分子层的突触素免疫反应产物的平均光密度(OD)值,同时测定该切片的胼胝体的OD值(因为该处内突触素免疫反应产物为阴性),以之作为背景,用所得值减去背景OD值得到校正的OD值(COD),即突触素免疫产物的实际光密度。

每只大鼠选取4个区域完整的5张切片,每张切片的每个测定部位的每个层次随机选取2个视野,取平均值。所有OD值的测量均在相同的光学条件下完成。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0 统计软件处理,计量资料以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),采用LSD 检验进行样本均数两两比较,计数资料间比较采用行×列表资料的 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠水迷宫训练7 d后的合格率比较

给药后14 d,每组共有10只大鼠参加水迷宫训练。NS组和P组大鼠合格率最高,均为90%,PK组大鼠合格率最低,为50%,K组居中,为60%,但差异无显著性。

2.2 各组大鼠海马CA3区突触素的表达

突触素免疫组织化学染色特征为突触前终末特

异性,在神经毡区呈颗粒状或点状免疫标记,神经元胞体、白质及血管不被染色。海马、齿状回出现明显免疫板层分布。海马本部以始层、辐射层染色较深,腔隙分子层次之,齿状回以分子层染色最深。

各组大鼠不同时间点海马CA3区突触素表达见图1,突触素的校正光密度值(COD)比较见表1。本研究发现,给药后24 h,NS组和P组大鼠海马CA3区有少量棕黄色颗粒状突触素阳性产物的分布,K组和PK组大鼠海马CA3区未见明显棕黄色颗粒状突触素阳性产物的分布;对突触素COD值比较发现,NS组最高、PK组最低($P < 0.05$)。给药后14 d时,NS组和P组大鼠海马CA3区有大量棕黄色颗粒状突触素阳性产物的分布,同时突触素COD值较给药后24 h有明显增加;K组大鼠海马CA3区有少量棕黄色颗粒状突触素阳性产物的分布,而PK组大鼠海马CA3区仅有少量点状突触素阳性产物的分布,K组和PK组突触素COD值较前缓慢增加。给药后28 d时,4组大鼠海马CA3区均可见大量棕黄色斑块状突触素阳性产物,此时4组突触素COD值差异无显著性。

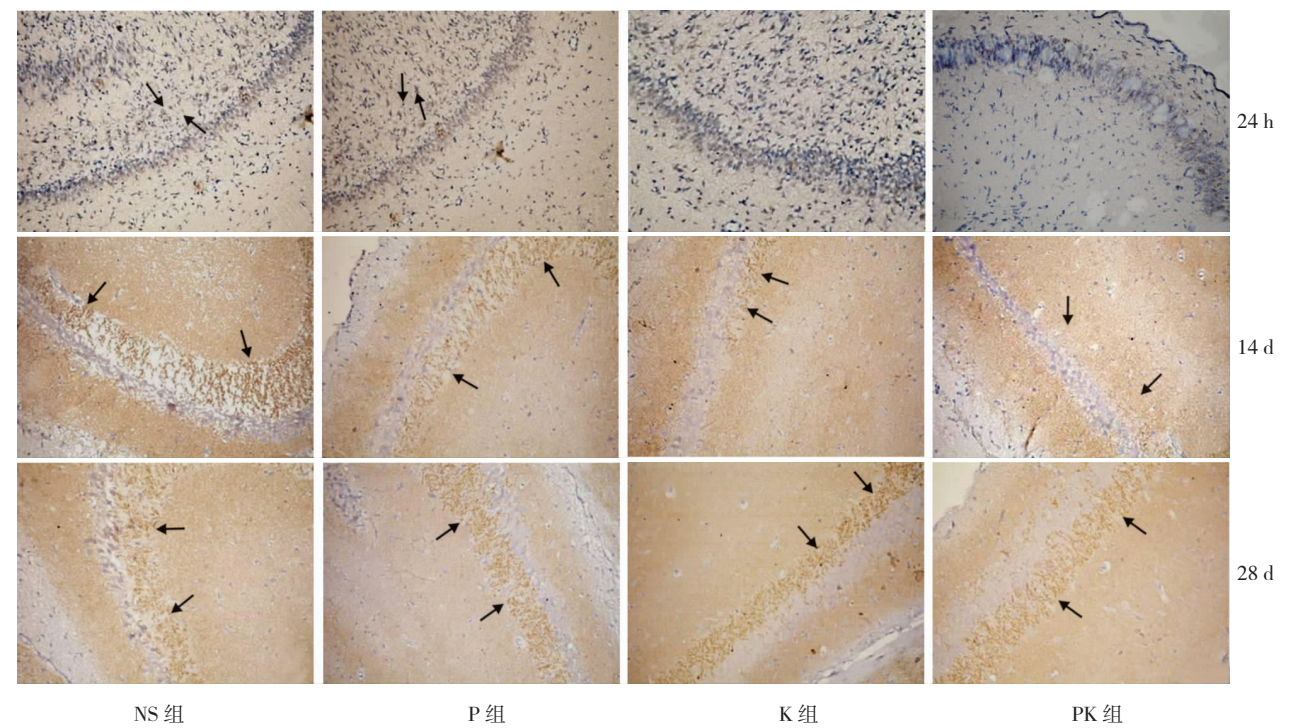


图1 4组大鼠给药后不同时间海马CA3区突触素的表达(×400) 上排为给药后24 h突触素的表达:NS组和P组可见海马CA3区少量棕黄色颗粒状突触素阳性产物,K组和PK组未见棕黄色颗粒状突触素阳性产物。中排为给药后14 d突触素的表达:NS组和P组可见海马CA3区大量棕黄色颗粒状突触素阳性产物,K组可见少量棕黄色颗粒状突触素阳性产物,PK组可见少量点状突触素阳性产物。下排为给药后28 d突触素的表达:4组海马CA3区均可见大量棕黄色斑块状突触素阳性产物。

表 1 各组大鼠海马 CA3 区突触素表达 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	给药后 24 h	给药后 14 d	给药后 28 d
NS 组	5	5.20 ± 0.89	7.97 ± 0.77	12.64 ± 0.53
P 组	5	5.19 ± 0.71	7.81 ± 0.70	12.72 ± 0.66
K 组	5	4.43 ± 0.58 ^a	5.86 ± 0.52 ^a	12.69 ± 0.58
PK 组	5	4.09 ± 0.57 ^{a,b}	5.11 ± 0.54 ^{a,b}	12.63 ± 0.59
F 值		4.13	49.07	0.055
P 值		0.013	0.000	0.983

a: 与 NS 组比较, $P < 0.05$; b: 与 K 组比较, $P < 0.05$.

3 讨论

神经元之间(包括神经元和肌细胞之间,神经元和腺细胞之间)的信息传递是由突触来完成的。突触素是突触囊泡的特异性整合糖蛋白,主要定位于突触前终末内,是突触前终末有效而特异的标记物。突触素免疫反应产物的定位和定量反映了突触的分布和密度。海马是内侧颞叶系统中与学习记忆最密切相关的结构,其中海马 CA3 区被认为与空间学习记忆密切相关^[13]。NMDA 受体对发育中大脑有营养作用,可促进神经元细胞的增殖、分化、迁移能力,对突触的可塑性有重要作用。在啮齿类动物大脑的快速发育期,NMDA 受体有一个高度敏感期,大约在出生到生后 2 周,这个时期给予 NMDA 受体拮抗剂可引起神经毒性和神经元细胞的凋亡和/或坏死。陈志斌等^[6]研究发现注射氯胺酮后 24 h,7 d 龄 SD 大鼠海马神经元细胞大量凋亡,突触素表达减少可能和氯胺酮神经毒性有关。Wang 等^[14]亦发现,NMDA 受体拮抗剂 PCP 引发的凋亡,对随后的神经发生和突触构建产生消极影响,并导致突触素表达的下降,说明 NMDA 受体拮抗剂也是影响突触素表达的一个因素。本实验结果显示单用氯胺酮(K 组)在给药后 24 h 突触素表达受抑制,这与上述结果吻合。但是,NMDA 受体引发凋亡的具体机制尚未明了,突触素表达的下降究竟是 NMDA 受体拮抗的直接后果还是继发于神经元细胞的凋亡,目前还不能作出结论。本实验研究亦发现两药合用组(PK 组)给药后 24 h 比 K 组更加抑制了突触素的表达,考虑系在大鼠脑发育的关键阶段,胆碱能受体和 NMDA 受体联合抑制影响了发育期脑的神经网络的构建^[15]。盐酸戊乙奎醚是新型选择性抗胆碱药物,目前有临床报道老年患者术前使用盐酸戊乙奎醚术后出现谵妄^[8],考虑是因为年龄增长,M 受体数量减少,麻醉因素使 M 受体 2G 蛋白复合体功能失调所致,其对婴幼儿及青壮年患者的影响未见报道。同时,动物行为学实验发现单用盐酸戊乙奎醚

不会抑制成年及老年鼠的学习记忆功能,但联合使用咪达唑仑或氯胺酮均对学习记忆功能抑制产生短期的协同作用^[16,17]。具体机制及对幼年鼠的影响也未见报道。本实验中单用盐酸戊乙奎醚组(P 组)在给药后 24 h 突触素表达与生理盐水组(NS 组)无明显差异,考虑对 M2 受体作用的缺失以及术前用药量较小可能是其未影响新生大鼠学习记忆功能的主要原因。

有实验研究表明,大鼠海马 CA3 区突触素表达呈增龄性改变,青年组最高;幼年组次之;从中年开始突触素的丢失大于突触素的合成;老年组突触素显著减少^[18]。另有研究表明新生大鼠脑神经细胞损伤后具有修复的可塑性,其时间持续至损伤后 14 d,突触素检测能较好地反映神经元和轴突的代偿再生情况^[19]。本实验发现,各组大鼠随着年龄增长突触素表达均有增加,但在水迷宫训练前 NS 组和 P 组增长较快,K 组和 PK 组较慢。运动训练亦可以促进脑损伤后某些基因及其产物的表达,有利于神经元结构和功能的修复。脑损伤后给予复杂的运动技巧训练,损伤周围及对侧运动皮质的不同亚型突触数目全面增加^[20]。Chen 等^[21]报道,中等强度体育训练可以增强海马区突触可塑性,并改善由于年龄增长造成的突触素水平的降低。空间辨别性学习记忆属于联合型学习中的操作式条件反射,目前建立空间辨别性学习记忆的行为模型的方法有很多,其中水迷宫法是利用动物的求生欲这一本能作为刺激,它对动物所引起的反应小,且操作方便,设施简易。而且 Becker 等^[22]的损毁法、O'Keefe 等^[23]的电生理记录及大量的实验证据均显示大鼠的空间学习记忆的中枢定位在海马,所以在以观察海马为实验对象的实验,水迷宫法要比其他法优越得多。国内亦有学者研究证实水迷宫法可以建立空间辨别性学习记忆的动物模型,同时发现获得空间辨别性学习记忆功能的模型大鼠海马内突触素的表达比对照组大鼠强,并有新的突触生成^[11]。本实验利用水迷宫法一方面观察给药后对大鼠空间辨别性学习记忆的影响,另一方面将空间辨别性学习训练当做康复训练,观察康复训练对大鼠海马 CA3 区突触素表达的影响。发现氯胺酮合用盐酸戊乙奎醚比单用氯胺酮更能抑制新生 7 d 龄大鼠(相当于人类的婴儿期)空间学习记忆能力和海马 CA3 区突触素的表达,但随着年龄的增长以及适当的学习训练,到出生后 35 d(即水迷宫训练后 28 d,相当于人类的青春期)突触素的表达可增加至正常水平。

[参 考 文 献]

[1] 刘毓和,吴新民,杜敏逸.咪唑安定、异丙酚和氯胺酮对老年大鼠认知功能的影响[J].中华麻醉学杂志,2006,26(4):315-317.

[2] 李凤鹏,郑健.脑内胆碱能烟碱受体与认知功能的关系[J].临床神经病学杂志,2004,17(3):236-238.

[3] 关新民.医学神经生物学纲要[M].北京:科学出版社,2003:52.

[4] 纵雪梅,庞涛,许铁,耿德勤,梁高永,燕宪亮.盐酸戊乙奎醚预处理对大鼠脑缺血/再灌注损伤所致脑梗死体积和神经元凋亡的影响[J].国际麻醉学与复苏杂志,2006,27(6):334-337.

[5] 武云飞,王志萍,江山,曾因明.多次氯胺酮麻醉对发育早期大鼠空间辨别学习记忆与海马CA1区突触长时程增强的影响[J].徐州医学院学报,2005,25(3):221-224.

[6] 陈志斌,杨天德.氯胺酮对SD幼鼠海马神经元细胞凋亡和突触素表达的影响[J].第三军医大学学报,2005,27(20):2042-2044.

[7] 马智聪,杨建新,马平.长托宁和东莨菪碱用作高血压患者术前用药的比较研究[J].中华新医学,2004,5(9):812-813.

[8] 朱广球,尤匡掌.麻醉前使用戊乙奎醚对老年人术后早期精神功能的影响[J].中国新药与临床杂志,2002,26(4):280-283.

[9] 彭博.盐酸戊乙奎醚致精神症状2例[J].医药导报,2007,26(7):814.

[10] 李茜,蔡舒,顾嘉宾.盐酸戊乙奎醚合用氯胺酮对小鼠学习记忆的影响[J].徐州医学院学报,2007,27(9):606-608.

[11] 宿宝贵,潘三强.大鼠海马结构在空间辨别性学习记忆时突触素表达的变化[J].中国病理生理杂志,2000,16(5):421-423.

[12] Gomez-Pinilla F,So V,Kesslak JP. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus[J]. Brain Res, 2001, 904(1):13-19.

[13] 潘三强,宿宝贵,韩辉,吕来清,李仲购,周丽丽,等.大鼠海马CA3区在学习记忆时突触可塑性的变化[J].解剖学杂志,2001,24(4):336-339.

[14] Wang C, Anastasio N, Popov V, Leday A, Johnson KM. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors by phencyclidine causes the loss of corticostriatal neurons[J]. Neuroscience, 2004, 125(2):473-483.

[15] Olney JW. New insights and new issues in developmental neurotoxicology[J]. Neurotoxicology, 2002, 23(6):659-668.

[16] 初春芹,桂波,陈玲.盐酸戊乙奎醚对老龄大鼠认知功能的影响[J].临床麻醉学杂志,2008,24(4):328-330.

[17] 袁力勇,戴体俊,王霞民.咪达唑仑与盐酸戊乙奎醚对小鼠学习记忆获得和巩固及再现的影响[J].医药导报,2007,27(1):7-10.

[18] 文敏,周波,康朝胜,臧贵勇,王景传,余资江.大鼠海马CA3区突触素的增龄性变化[J].山东大学学报(医学版),2008,46(3):229-231.

[19] 宋文秀,曹云涛,刘华庆.新生鼠脑缺血再灌注后海马CA1区突触素的表达及意义[J].第四军医大学学报,2004,25(16):1467-1469.

[20] Kleim JA, Jones TA, Schallert T. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury[J]. Neurochem Res, 2003, 28(11):1757-1769.

[21] Chen YC, Chen QS, Lei JL, Wang SL. Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse[J]. Brain Res, 1998, 806(2):238-245.

[22] Becker JT, Walker JA, Olton DS. Neuroanatomical bases of spatial memory[J]. Brain Res, 1980, 200(2):307-320.

[23] O'Keefe J, Speakman A. Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task[J]. Exp Brain Res, 1987, 68(1):1-27.

[24] 蒯建科,孙绪德,高昌俊.氯胺酮对新生大鼠认知功能和海马突触素表达的影响[J].医学研究生学报,2008,21(4):364-366.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

2010 年湘雅儿科国际论坛征文通知

中南大学湘雅医院、湘雅二医院、湘雅三医院及中国当代儿科杂志社将于2010年4月16~18日在湖南长沙联合举办“2010年湘雅儿科国际论坛”。本次论坛将邀请国际知名大学专家及国内各专业知名教授10余名,围绕目前儿科专业研究进展及热点问题进行专题讨论。本次论坛为与会者提供一个相互学习切磋的平台,是一次极好的同行专家交流的机会,特向全国征文。热忱欢迎全国同仁积极投稿。适宜刊登的稿件优先在中国当代儿科杂志上发表。现将征文的有关注意事项通知如下:

征文内容:包括儿科各个专业临床与基础方面的最新研究成果、研究动向;新技术、新进展以及临床治疗方面的经验与改进。

征文要求:文章要求为未公开发表过的学术论文;内容具有科学性、先进性,数据准确无误;来稿须有800字以内的摘要(包括目的、方法、结果、结论),以Word格式保存;稿件上务必注明作者姓名、单位、地址、邮编、电话和传真。

投稿方式:请将稿件以Email形式发送到xueshaicha@163.com,邮件主题写“2010湘雅儿科国际论坛征文”。

截稿日期:2010年3月31日。

联系人:中南大学湘雅医院儿科教研室及研究室 李清香老师

手机:13975883165; 电话:0731-84327208; 传真:0731-84327922。