

# 东莨菪碱与氯胺酮对幼鼠海马乙酰胆碱酯酶和 NMDA 受体 2B 亚基 mRNA 的相互影响

谈大海 张焰 曾因明 陈正

**【摘要】 目的** 探讨东莨菪碱与氯胺酮对幼鼠海马乙酰胆碱酯酶(AchE)和 NMDA 受体 2B 亚基 mRNA(NR2BmRNA)的相互影响。**方法** 1 月龄筛选合格 SD 大鼠 40 只随机分为正常对照组(C 组)、东莨菪碱组(S 组)、氯胺酮组(K 组)、东莨菪碱加氯胺酮组(SK 组)。S 组、SK 组腹腔注射东莨菪碱 0.8 mg/kg; 30 min 后 K 组、SK 组腹腔注射氯胺酮 50 mg/kg, 随后每 30 min K 组、SK 组腹腔注射氯胺酮 25 mg/kg, 共追加 2 次; C 组腹腔注射等体积的生理盐水。采用 Y 型迷宫进行学习能力测试, 测试结束后处死大鼠分离大鼠海马取右侧海马应用比色法测定 AchE 活性, 取左侧海马应用 RT-PCR 测定 NR2BmRNA 的表达。**结果** 东莨菪碱加氯胺酮组大鼠学习障碍加重, 训练时间和训练次数分别为(45.3 ± 2.9) min、(39.4 ± 3.2) 次, 高于东莨菪碱组[(41.3 ± 2.9) min、(35.0 ± 4.5) 次]和氯胺酮组[(40.5 ± 2.3) min、(36.0 ± 3.7) 次]; 东莨菪碱加氯胺酮组 AchE 活性测定和 NR2BmRNA 的表达分别为 2.46 ± 0.30, 0.72 ± 0.05, 高于东莨菪碱组(1.98 ± 0.25, 0.52 ± 0.04)和氯胺酮组(1.91 ± 0.28, 0.60 ± 0.04); 均差异有显著性( $P < 0.05$ )。**结论** 东莨菪碱与氯胺酮合用后对幼鼠海马 AchE 和 NR2BmRNA 产生相互作用, 抑制学习呈协同作用。

**【关键词】** 认知; 受体; N-甲基-D-天冬氨酸; 谷氨酸; 海马

**Scopolamine and ketamine produce interaction on the contents of AchE and expression of NR2B mRNA in hippocampus of juvenile rats** TAN Da-hai, ZHANG Yan, ZENG Yin-ming, et al. Department of Anesthesiology, The Fourth Hospital of Suzhou University, Wuxi 214062, China

**【Abstract】 Objective** To explore the interaction on the contents of AchE and expression of NR2B mRNA in hippocampus after combining scopolamine and ketamine to juvenile rats. **Methods** Forty one-month old qualified SD rats were divided at random into four groups with 10 rats each; control group(C group), scopolamine group(S group), ketamine group(K group), scopolamine and ketamine group(SK group). S, SK group were administered intraperitoneally scopolamine 0.8 mg/kg; and after a half hour, K, SK group were administered intraperitoneally ketamine 50 mg/kg, then KSK group were administered intraperitoneally ketamine 25 mg/kg every 30 minutes 2 times in total. C group were administered intraperitoneally equal volume physiological saline. The Y-maze was used to test the ability of learning on rats, then the animals were killed after the tests and left hippocampus were isolated for determination of NR2B mRNA expression using RT-PCR technique. The right hippocampus were isolated for determination of AchE contents using colorimetry. **Results** SK group appeared much more difficult in learning, which training time and training quantity (45.3 ± 2.9) min, (39.4 ± 3.2) were respectively higher than S group(41.3 ± 2.9) min, (35.0 ± 4.5) and K group(40.5 ± 2.3) min, (36.0 ± 3.7). AchE contents and NR2B mRNA expression of SK group(2.46 ± 0.30, 0.72 ± 0.05) were respectively higher than S group(1.98 ± 0.25, 0.52 ± 0.04) and K group(1.91 ± 0.28, 0.60 ± 0.04), there were significantly different( $P < 0.05$ ). **Conclusion** After co-administration of scopolamine and ketamine in juvenile rats, it produces interaction on the contents of AchE and expression of NR2B mRNA in hippocampus, and inhibit learning more in rats.

**【Key words】** Cognition; Receptor; N-methyl-D-aspartate; Glutamic acid; Hippocampus

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是指麻醉手术后出现的以精神错乱、焦虑、人格改变和记忆受损为主要临床表现的中枢神经系统的并发症,其确切发生机制至今不明。目前认为诱发 POCD 的因素可能包括某些麻醉药物、手术类型,如体外循环下心内直视手术、过度通气、长时间的低血压、低氧等<sup>[1]</sup>。POCD 的发病机制仍不清楚,

Moller 等<sup>[2]</sup>提出可能与全麻药物对中枢胆碱能、兴奋性氨基酸信号转导系统的作用有关。东莨菪碱是常用的麻醉前用药,是 M 胆碱受体拮抗剂,可阻断大脑皮质、隔区及海马结构中的 M 胆碱受体引起胆碱能系统功能障碍,从而产生学习记忆能力减退<sup>[3]</sup>。氯胺酮是常用的静脉麻醉药,是熟知的 NMDA 受体非竞争性阻断剂,可能通过阻断兴奋性氨基酸能神经通路而引起学习记忆损害<sup>[4]</sup>。二者常联合使用,以减少呼吸道的分泌,但能否加强遗忘作用、产生认知功能障碍尚未见报道。本实验拟研究先后注射东莨菪碱和氯胺酮对大鼠的脑内乙酰胆碱系统和兴奋性氨基酸系统的相互影响,以探讨 POCD 的可能机制。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 实验动物及分组 动物:1 月龄 SD 大鼠, 清洁级, 体质量 100 ~ 130 g。随机分为 4 组: 正常对照组、东莨菪碱组、氯胺酮组、东莨菪碱加氯胺酮组。

2. 实验药品、试剂和主要仪器 氢溴酸东莨菪碱注射液(080711), 上海禾丰制药有限公司; 盐酸氯胺酮注射液(KH080501), 江苏恒瑞医药公司; Y 型迷宫, 张家港生物医学仪器厂。

### 二、方法

1. 实验分组:1 月龄筛选合格 SD 大鼠 40 只分为正常对照组、东莨菪碱组、氯胺酮组、东莨菪碱加氯胺酮组。东莨菪碱组、东莨菪碱加氯胺酮组腹腔注射东莨菪碱 0.8 mg/kg; 30 min 后氯胺酮组、东莨菪碱加氯胺酮组腹腔注射氯胺酮 50 mg/kg, 随后每 30 min 氯胺酮组、东莨菪碱加氯胺酮组腹腔注射氯胺酮 25 mg/kg, 共追加两次; 生理盐水组腹腔注射等体积的生理盐水。

2. Y 型迷宫试验: 在安静的暗室内用 Y 型迷宫测定。迷宫箱底为铜栅间隔, 每臂末端有信号灯, 灯亮的一臂箱底铜栅无电流, 无光源的两臂及三臂连接处通电。测试前在迷宫中适应 5 min, 测试时调节刺激电压以保证大鼠在 10 s 内逃避跑动。大鼠受电击后直接跑到安全区为正确反应, 否则为错误反应。每次大鼠跑至安全区后持续光亮 15 s, 继而熄灯 45 s 后行下一次测试。灯光出现的方位按照 I-II-III-I 次序变换, 直至连续 10 次中有 9 次正确反应即为达到学会标准。观察指标如下: (1) 达到学会标准时总学习次数; (2) 达到学会标准时总训练时间<sup>[5]</sup>。

3. AchE 活性的测定: Y 迷宫试验测试结束后大鼠直接断头处死, 冰盘上快速取脑, 将右侧脑组织用冰生理盐水冲洗, 分离右侧海马, 加入预冷的生理盐水, 用匀浆器按 1:9 的比例制成 10% 的组织匀浆, 于 4℃ 在 3500 r/min 离心 10 min, 提取上清液 -20℃ 冻存待测。检测方法为比色法, 严格按试剂说明书操作, 结合匀浆液的蛋白浓度计算出每毫克组织蛋白水解产物胆碱的数量可反应 AchE 的活力。

4. NR2BmRNA 表达的检测: 采用 Trizol 法提取总 RNA: 取海马 100 mg, 液氮冷冻后碾碎组织置于 1.5 ml EP 管, 加入 1 ml 的 Trizol, 26 号注射器反复抽吸充分匀浆后, 室温放置 5 min, 加入 0.2 ml 氯仿混匀, 4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液加入等体积异丙醇混匀, -20℃ 放置 1 h, 于 4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入预冷的 70% 乙醇 1 ml 于 4℃ 下 7500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 超净工作台上干燥 10 min, 用 20 μl 的 DEPC 水溶解, 并用分光光度计测定 RNA 的浓度, -80℃ 保存。反转录合成 cDNA: 20 μl 的反应体系中加入 RNA 5 μg、0.5 μg/L 的 Oligo (dT) 18Primer 1 μl、RNase-free dd H<sub>2</sub>O 7 μl, 混匀静置 5 s 后

置于 70℃ (PCR 仪器上加热) 5 min, 冰上冷却 30 s, 再加入 5 × Reaction Buffer 4 μl, 20 U/μl 的 RNase Inhibitor 1 μl, 10 mmol/L 的 dNTP Mix 2 μl。混匀, 42℃ 5 min, 加 10 U/μl 的 AMV Reverse Transcriptase 2 μl, 42℃ 加热 60 min, 后 70℃ 加热 10 min, 储存于 -20℃。引物设计合成: 按照已报道的大鼠 NR2B 的 mRNA 序列, 设计合成相应的特异性引物, 同时合成 β-actin 的引物作为 PCR 反应的内对照。引物序列如下: NR2B: 5'-GTGGGCACTGAGGACTTGTT-3' 和 5'-TGTACGACATCAGCGAGGAC-3', β-actin: 5'-AGGGTGTGATGTGGGTATG-3' 和 5'-CATAGCTCTTCTCCAGGGAG-3'。根据各引物推导的 PCR 产物的大小分别为 NR2B: 319 bp, β-actin: 599 bp。PCR 扩增: 10 × Taq 缓冲液 2 μl, 25 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 1.2 μl, 10 mmol/L 的 dNTP 0.5 μl, 上下游引物各 10 pmol (各 1 μl), DNA 模板 25 ng (4 μl), Taq 聚合酶 0.5 μl, ddH<sub>2</sub>O 9.8 μl。热循环条件: 93℃ 1 min, 1 个循环; 93℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 最后于 72℃ 延伸 8 min, 取 6 μl PCR 扩增产物, 经 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭显色, 用 Tanon 凝胶系统进行观察, 以 Cisis 软件系统对各条阳性条带的密度进行分析。

5. 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组大鼠学习记忆能力测试结果

与 C 组相比 S 组达标时间延长, 训练次数增加 ( $P < 0.05$ ), 与 S 组相比 SK 组达标时间延长, 训练次数增加 ( $P < 0.05$ ), K 组与 S 组差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠认知功能指标的比较 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

指标	鼠数	训练时间 (min)	训练次数 (次)
C 组	10	33.6 ± 2.2	28.6 ± 2.2
S 组	10	41.3 ± 2.9 <sup>a</sup>	35.0 ± 4.5 <sup>a</sup>
K 组	10	40.5 ± 2.3	36.0 ± 3.7
SK 组	10	45.3 ± 2.9 <sup>b</sup>	39.4 ± 3.2 <sup>b</sup>

注: 与 C 组相比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 S 组相比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

### 二、各组大鼠海马 AchE 活性的比较

与 C 组相比 S 组 AchE 活性增加 ( $P < 0.05$ ), 与 S 组相比 SK 组 AchE 活性增加 ( $P < 0.05$ ), K 组与 S 组差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组大鼠海马 AchE 活性的比较 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

指标	AchE 活性 (U/mg)
C 组	1.48 ± 0.22
S 组	1.98 ± 0.25 <sup>a</sup>
K 组	1.91 ± 0.28
SK 组	2.46 ± 0.30 <sup>b</sup>

注: 与 C 组相比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。与 S 组相比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

### 三、各组大鼠海马 NR2BmRNA 的表达

对照组 NR2BmRNA 的表达为  $0.45 \pm 0.03$ , 氯胺酮组 NR2BmRNA 的表达 ( $0.60 \pm 0.04$ ) 高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 与氯胺酮组相比东莨菪碱加氯胺酮组 NR2BmRNA 的表达 ( $0.72 \pm 0.05$ ) 进一步增多 ( $P < 0.05$ )。东莨菪碱组 NR2BmRNA 的表达为  $0.52 \pm 0.04$ , 相比对照组也是增多的 ( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

研究表明, Ach 是记忆痕迹形成的必要神经递质和长期记忆的生理基础, Ach 含量的变化可通过其水解酶 AchE 的活性反映出来。AchE 作为胆碱能系统的关键酶, 其活力直接反映该系统的功能状态, AchE 活性增加可导致学习记忆活动障碍<sup>[6]</sup>。脑内乙酰胆碱及突触前胆碱受体数目减少、ChAT 活性降低及 AchE 活性升高, 作为 POCD 和老年生理性退变的共同的发病机制, 可引起大脑皮质胆碱神经元递质功能紊乱。大量研究发现抗胆碱药可明显影响学习记忆, 将东莨菪碱注入大鼠双侧海马腹侧、丘脑中间背侧可损害空间记忆, 给予 M 胆碱能受体激动剂可改善东莨菪碱引起的遗忘<sup>[7]</sup>。N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体是兴奋性氨基酸中谷氨酸受体的一种重要亚型, 在认知中的作用日益受到重视, 脑突触的长时程增强 (LTP) 现象主要由于其诱导和维持, 而 LTP 是海马和其他脑区形成记忆的重要神经生理机制。NMDA 受体至少存在七个亚单位, 即 NR1 亚单位, 4 种 NR2 亚单位 (包括 NR2A, NR2B, NR2C 和 NR2D) 以及两种 NR3 亚单位 (NR3A 和 NR3B)。Bliss 将 NR2B 命名为聪明基因, 提出该基因和学习记忆密切相关<sup>[8]</sup>。氯胺酮是 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂, 通过阻断 NMDA 受体抑制学习记忆能力; 此外, 其低剂量就能抑制 M 受体的作用而产生遗忘作用<sup>[9]</sup>。研究发现, M 受体与多种神经递质系统之间存在着广泛的关系。实验表明, M 受体的激活可增强 GABA 能神经元的活性, 易化 NMDA 受体的神经传导。除了谷氨酸, 其他神经递质如去甲肾上腺素、Ach、5-HT 等均可影响细胞膜电位而间接影响 NMDA 受体通道的开放<sup>[10]</sup>。

本实验所用东莨菪碱和氯胺酮的剂量均在常用剂量范围内, 由大鼠剂量换算求得。结果发现, 使用东莨菪碱后幼鼠海马胆碱脂酶活性高于对照组并有显著差异, 加用氯胺酮后幼鼠海马胆碱脂酶活性进一步增高, 高于单独使用东莨菪碱组并有显著差异。本实验观察到在大鼠生长发育时期注射氯胺酮会导致海马组织中的 NR2BmRNA 出现表达上调, 以往研究结果也证实氯胺酮能够导致生长发育期大鼠 NMDA 受体表达增

强, 从而降低大鼠认知功能<sup>[11]</sup>。在同时使用氯胺酮和东莨菪碱后, NR2BmRNA 的表达进一步增多高于单独使用氯胺酮组并有显著差异。研究表明, NMDA 受体功能具有双面性, 其正常表达为神经系统发育和功能重塑所必需, 但是 NMDA 受体的过度表达却会引起兴奋性神经毒性, 从而影响学习和记忆功能<sup>[12]</sup>。以上结果显示二药合用对幼鼠海马 AchE 和 NR2BmRNA 产生相互作用, 比单用更能使幼鼠学习功能减退, 说明二药在造成认知功能障碍上有一定的协同作用, 其机制可能是通过 M 受体和 NMDA 受体这两条途径的协同而加重了学习障碍, 东莨菪碱组 NR2BmRNA 的表达相比对照组增多也证实了这一点。实验结果进一步提示 POCD 可能与全麻药物对中枢胆碱能、兴奋性氨基酸系统的作用有关, 两个系统之间可能通过某些神经递质相互作用。

## 参 考 文 献

- [1] Rasmussen LS, Johnson T, Kuipers HM, et al. Dose anaesthesia cause postoperative dysfunction? A randomized study of regional versus general anaesthesia in 438 elderly patients. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2003, 47: 260-266.
- [2] Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, et al. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly: Isopocdi study. *Lancet*, 1998, 351: 857-861.
- [3] Kim DH, Kim do Y, Kim YC, et al. Nodakenin, a coumarin compound ameliorates scopolamine-induced memory disruption in mice. *Life Sci*, 2007, 80: 1944-1950.
- [4] Wang C, Sadovova N, Fu X, et al. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in ketamine-induced apoptosis in rat forebrain culture. *Neuroscience*, 2005, 132: 967-977.
- [5] 方强, 张焰, 任炳旭, 等. 老年大鼠空间记忆与海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基 mRNA 的表达. *中国行为医学科学*, 2008, 17: 979-981.
- [6] Yamauchi Y, Hiqashi M, Matsuno T, et al. Ameliorative effects of azaindozine derivative ZSET845 on scopolamine-induced deficits in passive avoidance and radial-arm maze learning in the rat. *Jpn J Pharmacol*, 2001, 87: 240-244.
- [7] Vogt KE, Regehr WG. Cholinergic modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 area of the hippocampus. *J Neurosci*, 2001, 21: 75-83.
- [8] Bliss TV. Young receptors make smart mice. *Nature*, 1999, 401: 25-27.
- [9] Pratico C, Quattrone D, Lueanto T, et al. Drugs of anesthesia acting on central cholinergic system may cause post-operative cognitive dysfunction and delirium. *Med Hypotheses*, 2005, 65: 972-982.
- [10] Cuonor JA, Petwzzino J, Pozzo-Miller LD, et al. Calcium signals in long-term potentiation and long-term depression. *Can J Physiol Pharmacol*, 1999, 77: 722-734.
- [11] 蒯建科, 韩丽春, 柴伟, 等. 新生大鼠氯胺酮麻醉后认知功能的远期改变和机制. *中国行为医学科学*, 2007, 16: 789-791.
- [12] Selkirk JV, Stiefel TH, Stone IM. Over-expression of the human EAAT2 glutamate transporter within neurons of mouse organotypic hippocampal slice cultures leads to increased vulnerability of CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci*, 2005, 21: 2291-2296.

(收稿日期: 2009-06-09)

(本文编辑: 冯学泉)