

多次氯胺酮麻醉对未成年大鼠学习记忆能力和磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白的影响

任炳旭 张焰 王华 张建楠

【摘要】 目的 探讨多次氯胺酮麻醉对未成年大鼠记忆能力的影响及其可能机制。方法 21 日龄筛选合格 SD 大鼠 64 只,分为氯胺酮组(包括 k1 和 k7 两个亚组:氯胺酮 75 mg/kg 腹腔注射,每日 1 次,连续注射 7 d,分别于第 8 天和第 14 天进行首次训练,一部分训练结束 1 h 取材,一部分 3 d 后再次训练)、生理盐水组(注射等体积的生理盐水)、假训练组(取生理盐水组平均训练时间、次数训练,训练结束 1 h 取材)、正常组(迷宫中适应 5 min 取材)。采用 Y 型迷宫进行记忆能力测试,应用免疫组化法检测海马磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白(p-CREB)的表达。结果 k1 组学习次数、时间[分别为(51.88 ± 15.93)次,(53.38 ± 19.03)min]高于生理盐水组[分别为(25.50 ± 6.78)次,(21.88 ± 8.11)min](P < 0.05),k1 组记忆保持率、p-CREB 蛋白阳性神经元[分别为(61.25 ± 6.41)%,(28.62 ± 2.92)个]低于生理盐水组[分别为(87.50 ± 13.89)%,(71.13 ± 7.23)个](P < 0.05);而 k7 组[分别为(22.75 ± 7.65)次,(24.13 ± 9.01)min,(87.50 ± 10.35)%,(71.00 ± 6.93)个],与生理盐水组相比差异无统计学意义。正常组 p-CREB 蛋白阳性神经元[(7.75 ± 1.28)个]低于生理盐水组和氯胺酮组(P < 0.05),但与假训练组[(7.75 ± 1.49)个]相比差异无统计学意义。结论 多次氯胺酮麻醉可短期影响未成年大鼠记忆能力,其机制可能与抑制海马 p-CREB 表达有关。

【关键词】 氯胺酮; 未成年; 学习记忆; 海马; 磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白

Effect of repeated ketamine administration on learning and memory ability and p-CREB expression of infant rats REN Bing-xu, ZHANG Yan, WANG Hua, et al. Department of Anesthesiology, The Fourth People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214062, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of repeated ketamine administration on memory ability of infant rats and the possible mechanism. **Methods** Sixty-four SD rats of 21 days old were divided into ketamine group (including two subsets:k1 group and k7 group). The rats were anesthetized with 75 mg/kg ketamine per day for 7 times, and were trained respectively at one day and seven days after the last injection. Some rats of the two groups were killed at one hour after the first training, and others were trained again at three days after the first training), normal saline group (the rats were given equal volume of 0.9% saline), pseudotraining group (the rats were trained according to the average training time and times of normal saline group and were killed at one hour after the training) and passive control group (the rats were killed after 5 minutes staying in the Y-maze). Y-maze was used to test the memory ability. P-CREB protein was tested by immunohistochemistry. **Results** The training time and times in k1 group [(53.38 ± 19.03)min,(51.88 ± 15.93)times] were higher than those in normal saline group [(21.88 ± 8.11)min,(25.50 ± 6.78)times](P < 0.05). The memory consolidation rate and the p-CREB protein expressing cells of k1 group [(61.25 ± 6.41)%,(28.62 ± 2.92)] were fewer than those in normal saline group [(87.50 ± 13.89)%,(71.13 ± 7.23)] (P < 0.05). There were not significantly different between k7 group [(22.75 ± 7.65)times,(24.13 ± 9.01)min,(87.50 ± 10.35)%,(71.00 ± 6.93)] and normal saline group. The number of p-CREB expressing cells was greater in normal saline group and ketamine group than that in passive control group[(7.75 ± 1.28)], which was not significantly different between pseudotraining group[(7.75 ± 1.49)] and passive control group. **Conclusion** Administration of repeated ketamine may temporarily affect the memory ability of infant rats through suppressing the expression of p-CREB protein in the hippocampus.

【Key words】 Ketamine; Infant; Learning and memory; Hippocampus; p-CREB

氯胺酮具有较强的镇痛和麻醉作用,是儿科手术常用的麻醉药。临幊上烧伤创面、感染创面等情况常需频繁换药,为减轻患儿痛苦,氯胺酮仍是目前较为理想的麻醉药。但氯胺酮作为 NMDA 受体非竞争性拮抗剂可影响机体的学习记忆能力^[1-2],近年来人们对氯

胺酮和学习记忆之间的关系进行了研究,但多集中在单次应用氯胺酮对成年机体的影响上,而多次氯胺酮麻醉对未成年机体记忆能力的影响及其机制尚无定论。本实验通过 Y 型迷宫进行记忆能力测试,应用免疫组化法检测大鼠海马 p-CREB 的表达,以探讨多次氯胺酮麻醉对未成年大鼠记忆能力的影响及其可能机制。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物: 21 日龄 SD 大鼠(体质量 60~80 g), 浙江实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(浙)2003-0001。

2. 药品、试剂和主要仪器: (1)盐酸氯胺酮注射液, 江苏恒瑞医药公司, 批号: KH060501; (2)兔抗鼠 p-CREB 抗体, 北京博奥森公司, 浓度 1:350; (3)Super-PicTure 聚合物检测试剂盒, 美国 Zymed 公司; (4)Y 型迷宫, 张家港生物医学仪器厂; (5)OLYMPUS BX50 型显微镜及成像系统; (6)LeicaIM2145 切片机; (7)Thermo Shandon 脱水机; (8)LEICA 染色机。

二、方法

1. 动物分组及处理: 筛选对电击反应敏感, 逃避迅速的大鼠, 各组平均体质量和性别比例基本相同。筛选合格 21 日龄 SD 大鼠共 64 只, 分为氯胺酮组(包括 k1 和 k7 两个亚组: 氯胺酮 75 mg/kg 腹腔注射, 每日 1 次, 连续注射 7 d, 分别于第 8 天和第 14 天进行首次训练, 一部分训练结束 1 h 取材, 一部分 3 d 后进行第 2 次训练)、生理盐水组(生理盐水 2 ml 腹腔注射, 每日 1 次, 连续注射 7 d 后 1 d 进行第 1 次训练, 一部分训练结束 1 h 取材, 一部分 3 d 后进行第 2 次训练)、假训练组(取生理盐水组平均训练时间、平均训练次数, 无规律变换灯光方位及电击臂区, 训练结束 1 h 取材)、正常组(迷宫中适应 5 min 取材)。k1 组、k7 组和生理盐水组每组 16 只大鼠, 正常组、假训练组每组 8 只大鼠。实验时有吸氧装置(自制透明容器中通入氧气, 流量 2 L/min)保证大鼠的氧气供应, 除实验时间外大鼠可以自由摄食及饮水。

2. 记忆能力测试: 在安静的暗室内测定。迷宫箱底为铜栅间隔, 每臂末端有信号灯, 灯亮的 1 臂箱底铜栅无电流, 无光源的两臂及 3 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^[2]。72 h 后以同样方法进行第 2 次训练, 每只大鼠训练 10 次, 正确率为 72 h 记忆保持率。

3. 免疫组化检测: 各组动物训练后 1 h(正常组在迷宫适应 5 min 后)腹腔注射 10% 水合氯醛(0.4 ml/100 g)麻醉动物。开胸后剪开右心耳, 左心室插管, 生理盐水 60 ml 快速灌注, 随后用 10% 甲醛溶液 60 ml 灌注。灌毕立即开颅取全脑, 解剖出双侧海马, 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、切片。切片分为两套, 一套滴加选择性一抗, 一套以 PBS 代替一抗作阴性对照。

4. p-CREB 免疫阳性细胞计数: 在显微镜下分别

对各组动物海马区的 p-CREB 免疫阳性细胞进行计数。每只动物取 3 张切片, 每张切片选取 3 个无重叠的高倍(400 倍)视野, 分别计数阳性神经元, 得到每张切片阳性神经元均数, 进而求得每只大鼠免疫阳性神经元均数, 最后计算每组大鼠免疫阳性神经元均数。

5. 统计处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。样本均数间两比较用 Dunnett T3 检验, 检验水准: $\alpha = 0.05$ 。统计分析采用 SPSS 13.0 统计软件。

结 果

一、各组大鼠学习记忆能力测试结果

与生理盐水组相比, k1 组达到学会标准所需学习次数、时间增加($P < 0.05$), 72 h 记忆保持率下降($P < 0.05$), 而 k7 组差异无显著性。见表 1。

表 1 各组大鼠学习记忆能力测试结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	次数(次)	时间(min)	记忆保持率(%)
生理盐水组	8	25.50 ± 6.78	21.88 ± 8.11	87.50 ± 13.89
k1 组	8	51.88 ± 15.93 *	53.38 ± 19.03 *	61.25 ± 6.41 *
k7 组	8	22.75 ± 7.65	24.13 ± 9.01	87.50 ± 10.35

注: 与生理盐水组相比, * $P < 0.05$

二、各组大鼠海马 p-CREB 蛋白表达结果

与生理盐水组相比, k1 组海马神经元 p-CREB 表达减少($P < 0.05$), 而 k7 组差异无显著性。与正常组相比, 生理盐水组、氯胺酮组海马神经元 p-CREB 表达增多($P < 0.05$), 而假训练组差异无显著性。见表 2。

表 2 各组大鼠海马 p-CREB 蛋白表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	p-CREB 蛋白阳性神经元(个)
正常组	8	7.75 ± 1.28 *
生理盐水组	8	71.13 ± 7.23 ▲
假训练组	8	7.75 ± 1.49 *
k1 组	8	28.62 ± 2.92 *▲
k7 组	8	71.00 ± 6.93 ▲

注: 与生理盐水组相比, * $P < 0.05$; 与正常组相比, ▲ $P < 0.05$

讨 论

学习记忆的神经生物学基础之一是中枢神经系统的突触可塑性。海马突触传递的长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD)是突触可塑性的主要形式, 而 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR)在 LTP 和 LTD 的诱发和维持中起关键作用^[3]。p-CREB 是细胞核内环腺苷酸应答元件结合蛋白(CREB)的活化形式, 记忆的形成依赖 p-CREB 通路诱导下游基因的表达^[4]。NMDAR 激活后钙离子进入细胞内激活多种蛋白激酶, 使 CREB 磷酸化而活化^[5]。氯胺酮为 NMDAR 非竞争性拮抗剂, 作用于 NMDAR 的 PCP 结合位点, 故可能影响机体记忆能力, 尤其是在多次使用的情况下。未成熟脑内 NMDAR 含量较成熟脑丰富^[6], 并且在脑发育过程中 NMDAR 亚单位组成也发生改变^[7-8]。因此, NMDAR 拮抗剂在脑发育不同阶段可能产生不同

作用。本实验以达到学会标准所需学习次数、时间和记忆保持率(第 2 次训练的正确率)来表示大鼠的记忆能力,氯胺酮剂量由人鼠剂量换算及预实验求得。结果发现,生理盐水组大鼠训练后 1h 海马 P-CREB 表达明显增加,与以往研究结果相同^[9]。与生理盐水组相比,k1 组大鼠记忆能力下降,同时海马神经元 p-CREB 表达减少;而 k7 组差异无统计学意义。说明氯胺酮只是短期抑制海马 p-CREB 的表达和影响未成年大鼠的记忆能力。假训练组大鼠海马 p-CREB 的表达与正常组相比,两者无显著差异。说明在本实验条件下,海马 p-CREB 的表达主要是与学习记忆训练有关,而与光电等刺激无关。

综上所述,海马 P-CREB 表达参与了机体的学习记忆过程,多次氯胺酮麻醉可短期影响未成年大鼠的记忆能力,这种影响可能与氯胺酮抑制海马 P-CREB 表达有关,而未成年大鼠多次氯胺酮麻醉后 24h 仍能抑制海马 P-CREB 表达的具体机制尚不清楚。是否多次应用氯胺酮麻醉干扰了海马 NMDAR 的兴奋活性进而影响海马 P-CREB 的表达从而使大鼠记忆能力下降,以及 7d 后大鼠记忆能力的恢复是 NMDAR 的兴奋活性恢复还是 NMDAR 的代偿性上调,仍需进一步研究。

参 考 文 献

- Abel KM, Allin MP, Hemsley DR, et al. Low dose ketamine increases prepulse inhibition in healthy men. *Neuropharmacology*, 2003, 44: 729-737.
- 徐静, 万燕杰, 曾因明, 等. 手术创伤对大鼠空间记忆能力及海马 GFAP 和 S100 蛋白表达的影响. 中国行为医学科学, 2006, 15: 302-304.
- Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100: 433-442.
- Impey S, Smith DM, Obrietan K, et al. Stimulation of cAMP response element(CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci*, 1998, 1: 595-601.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 405-414.
- Insel TR, Miller LP, Gelhard RE. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-d-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, 1990, 35: 31-43.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, et al. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem*, 1997, 68: 469-478.
- 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.
- Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J Neurosci*, 2003, 23: 3547-3554.

(收稿日期:2007-12-23)

(本文编辑:冯学泉)

• 简 讯 •

《中国行为医学科学》第四届编辑委员会换届工作启动

《中国行为医学科学》第三届编辑委员会从 2004 年经中华医学会批复成立,到 2008 年其任期将到。根据中华医学会杂志社对期刊编辑委员会任期和换届调整的相关规定,经报请中华医学会杂志社同意,中国行为医学科学编辑部将启动第四届编辑委员会的换届工作。

本次换届工作在《中国行为医学科学》第三届编辑委员会及主编的领导下,由中国行为医学科学编辑部具体组织实施。本次换届工作正式启动后,其主要信息将在本刊网站和杂志上同时公布,除了体现其客观、公正、透明以外,也希望能够得到本学科及相关学科专家学者的更多关注和支持,使更多热爱杂志工作的专家学者能够脱颖而出。

本次换届工作的指导思想是通过客观、公正、透明的换届选举活动,真正选出能够体现我国行为医学学术研究水平并且热爱杂志工作的有代表性人选,有利于行为医学学科专业人才的成长,有利于杂志工作的可持续发展,进而促进我国行为医学事业的进步和学术活动的繁荣。

本次换届工作的日程安排:2008 年 7 月通过电子邮件和网站(www.xwyx.cn)发布等方式向现任编委、中华医学会行为医学分会委员和部分特邀审稿专家通报本次换届活动的基本情况,采用调查表完成现任编委的去留意向、新编委人选推荐以及欲留任编委、新推荐编委、自荐编委所在工作单位的意见等换届活动相关的调查,于 9 月底收回调查表;10 月在调查基础上与中华医学会行为医学分会、上届常务编委等相关各方协商形成并提出第四届编委的初步名单;10 月中下旬根据各方面反馈意见确定新一届编委名单。11 月将新一届编委会名单正式行文上报中华医学会审批。

现将编委会换届工作有关事宜通知如下:

- 登录本刊网站“编委会”栏目浏览有关《中国行为医学科学》第四届编辑委员会换届办法、编辑委员会组织结构和聘任人数的说明、关于通讯编委的说明、编辑委员的职责、权利和义务、中华医学会系列杂志编辑委员会通则和《中国行为医学科学》办刊质量报告等。
 - 登录本刊网站下载“换届调查表”,填写换届调查表后,以电子邮件和邮局(单位盖章)两种方式寄回本刊编辑部。
 - 换届调查表请在 2008 年 9 月 20 日前寄回,高校放假单位可延迟到 2008 年 10 月 10 日。
- 网站地址:<http://www.xwyx.cn>; 编辑部邮箱:xwyxjb@188.com; xwyxjb@163169.net。
- 编辑部地址:山东省济宁市建设南路 45 号(济宁医学院内)中国行为医学科学编辑部;联系电话:0537-2203907, 2400106, 2208186