

# 丙泊酚复合皮质酮对大鼠海马 pCaMK II 表达的影响

陶红蕾<sup>1</sup>, 周程<sup>1</sup>, 王玉慧<sup>1</sup>, 姜云峰<sup>1</sup>, 谢玉波<sup>2</sup>(<sup>1</sup>.浙江省立同德医院麻醉科, 杭州 310012; <sup>2</sup>.广西医科大学第一附属医院科研部, 南宁 530021)

**摘要:** 目的 探讨丙泊酚复合皮质酮对大鼠海马神经元  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin dependent kinase II, pCaMK II) 表达水平及细胞超微结构的影响。方法 36 只 21 d 龄 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、丙泊酚组、丙泊酚+皮质酮组 3 组, 分别以生理盐  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、丙泊酚  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、丙泊酚  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +皮质酮  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  进行腹腔注射, 连续用药 8 d, 每组随机取 6 只以免免疫组织化学法检测大鼠海马 CA1 区 pCaMK II 的表达水平, 取其余大鼠的海马组织制备透射电镜超薄切片以观察海马神经元超微结构变化。结果 与正常对照组相比较, 丙泊酚组和丙泊酚+皮质酮组 2 组大鼠海马 CA1 区神经元的 pCaMK II 表达水平明显降低( $P<0.05$ ); 与丙泊酚组相比较, 丙泊酚+皮质酮组 pCaMK II 的表达更低( $P<0.05$ )。电镜分析表明, 丙泊酚组和丙泊酚+皮质酮组 2 组大鼠的海马神经元及细胞器发生了不同程度的改变。结论 连续 8 d 使用  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  丙泊酚, 大鼠海马 CA1 区神经元 pCaMK II 的表达下调; 丙泊酚复合皮质酮进一步抑制 pCaMK II 的表达, 损伤大鼠海马神经元结构。

**关键词:** 丙泊酚; 皮质酮; CaMK II

**中图分类号:** R965.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1007-7693(2014)04-0409-04

**DOI:** 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.006

## Combined Effects of Propofol and Corticosterone on the Expression of Phosphorylated $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent Protein Kinase II in Hippocampus Region of Rats

TAO Honglei<sup>1</sup>, ZHOU Cheng<sup>1</sup>, WANG Yuhui<sup>1</sup>, JIANG Yunfeng<sup>1</sup>, XIE Yubo<sup>2</sup>(<sup>1</sup>.Department of Anesthesiology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, 310012; <sup>2</sup>.Department of Scientific Research, The first Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effects of propofol and corticosterone on the expression of phosphorylated  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (pCaMK II) and cellular structure in hippocampal CA1 region. **METHODS** Thirty-six Wistar rats (21-day-old) were randomly divided into 3 groups: control group; propofol group; propofol+corticosterone group. Rats were received intraperitoneal injection of  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  normal saline,  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  propofol or  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  propofol+ $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  corticosterone for 8 consecutive days, respectively. In each group, six rats were selected at random for detection of the expression of pCaMK II in hippocampal CA1 area by immunohistochemical assay and the rest were used to observe the neuronal ultrastructure with transmission electron microscope. **RESULTS** The expression of pCaMK II in hippocampal CA1 neurons was significantly down-regulated in propofol group and propofol+corticosterone group, compared with that in control group. Electronic microscopic analysis showed that the ultrastructural of hippocampal neurons were damaged in both propofol group and propofol+corticosterone group. **CONCLUSION** Repeated propofol administration can reduce the expression of pCaMK II, damage the structure of neurons. The combined application of propofol and corticosterone aggravates this effect.

**KEY WORDS:** propofol; corticosterone;  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase- II

丙泊酚(propofol)是一种新型短效的全麻药, 其临床特点是起效快、持续时间短、苏醒迅速而平稳, 被广泛应用于成人麻醉诱导和维持<sup>[1-2]</sup>。然而临床观察发现, 丙泊酚麻醉后部分患者出现遗忘、学习能力降低及记忆障碍等现象<sup>[3]</sup>, 其机制迄今尚未探明。在哺乳动物脑内, 海马结构是与学习记忆相关的重要脑区<sup>[4]</sup>, 近年来的大量研究表明

海马 CA1 亚区中的一些蛋白质如  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin dependent kinase II, CaMK II), 通过磷酸化修饰等活性形式在海马依赖的学习记忆高级功能中发挥着潜在的重要作用, 这种作用可受体内生理、病理状况的影响<sup>[5-6]</sup>。另外, 皮质酮(corticosterone, CORT)是哺乳动物体内一种主要的糖皮质激素, 在应激反

应时表达水平会增高，进而改变脑内突触可塑性，影响海马相关的学习与记忆能力，因而皮质酮损伤型大鼠海马模型是一种研究学习记忆的病理模型<sup>[7]</sup>。本研究拟复合使用高浓度皮质酮造模，进一步观察丙泊酚对幼年大鼠海马内神经元结构和CaMKⅡ表达活性的影响情况，探索丙泊酚复合高浓度皮质酮引起大鼠学习记忆能力改变的可能机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

21 d 龄 Wistar 大鼠 36 只，♀♂，体质量 45~60 g，实验动物生产许可证号：SCKG 桂 2003-0003；实验动物使用许可证号：SYKG 桂 2003-0005；由广西医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 仪器与试剂

丙泊酚(AstraZeneca 公司，批号：X13023B，纯度：1%); 皮质酮(Sigma 公司，批号：C2505，纯度：95%); 兔抗鼠 pCaMKⅡ多克隆抗体(Santa Cruz 公司); 羊抗兔 IgG、氨基联苯胺(DAB)、PBS 缓冲液粉剂、柠檬酸抗原修复液、EDTA 抗原修复液、苏木素染色剂及中性树胶均购自福州迈新生物技术有限公司；30%过氧化氢(分析纯，重庆川江化学试剂厂)；多聚甲醛(上海国药集团试剂有限公司)；大鼠立体定位仪(上海川沙花机厂)；显微镜(OLYMPUS 公司)。

## 2 方法

### 2.1 实验分组

将 Wistar 大鼠随机分为 3 组，每组 12 只，分别给予腹腔注射 0.9% 生理盐水 10 mL·kg<sup>-1</sup>(正常对照组)、丙泊酚 100 mg·kg<sup>-1</sup>(丙泊酚组)、丙泊酚 100 mg·kg<sup>-1</sup>+皮质酮 10 mg·kg<sup>-1</sup>(丙泊酚+皮质酮组)。每天早上 8:00 开始实验，连续用药 8 d。

### 2.2 免疫组织化学样本的制备

第 8 天药物注射实验结束后，从每组大鼠中随机抽取 6 只，以 1% 戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉，经左心室快速灌注生理盐水 200 mL 后，再以 4% 多聚甲醛 200 mL 灌注，断头取视交叉后 5 mm 至小脑前的脑组织块，置于 4 ℃ 的 4% 多聚甲醛中后固定 12 h，经脱水、透明、浸蜡、修块后切片，片厚 4 μm。采用亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC 法)依次进行免疫组织化学处理。切片常规脱蜡、水化，以柠檬酸缓冲液高温修复抗原，0.3% Triton 处理 30 min，随后滴加

pCaMKⅡ(1:200)抗体，置于 4 ℃ 孵育 24 h(阴性对照以正常羊血清替代一抗)，加入生物素标记的羊抗兔 IgG(1:200)于室温放置 2 h，然后用辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液(1:200)室温孵育 1 h，最后以 DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 混合工作液显色，其间用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 充分洗涤。常规脱水、透明、树胶封片，选择海马 CA1 区为观察部位，每张切片各取 3 个视野，置光学显微镜下观察并摄片。使用彩色病理图文分析系统对海马 CA1 区 pCaMKⅡ 染色进行灰度值测量，在 400 倍视野下，每张切片取 5 个视野，应用彩色病理图文分析系统，计算神经元染色灰度值，以 pCaMKⅡ 阳性细胞的灰度值表示 pCaMKⅡ 的表达。灰度值愈小(纯黑的灰度为 0；纯白的灰度为 255)，染色愈深，异染性颗粒含量愈多，即灰度值与异染性颗粒的含量呈反比。因此灰度值越高，pCaMKⅡ 阳性表达越弱。

### 2.3 电镜样本制备

每组剩余 6 只大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 30 mg·kg<sup>-1</sup> 麻醉后，经升主动脉灌注生理盐水 200 mL，继续用含 4% 多聚甲醛和 2% 戊二醛的 PBS 溶液 200 mL 经左心灌注固定。断头取视交叉后 5 mm 至小脑前的脑组织块，大鼠立体定位仪下取 CA1 区 1 mm<sup>3</sup> 的组织块，放入 2.5% 的戊二醛中在 4 ℃ 条件下固定 2 h，依次进行 PBS 冲洗、锇酸固定、乙醇脱水、丙酮脱水、Epon618 环氧树脂+100% 丙酮浸透，于 36~60 ℃ 聚合后制成 50 nm 超薄切片，以醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染。每组每个切片选取 10 个不同部位拍摄电镜照片 10~15 张，电镜下神经元放大 3 800 倍，观察分析神经元细胞核、线粒体、粗面内质网、核糖体结构等方面形态变化。

### 2.4 统计分析

实验数据以 SPSS13.0 统计软件处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用单因素方差分析；当  $P < 0.05$  时，差异被认为有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 免疫组化实验结果

阴性对照实验结果为阴性。pCaMKⅡ 的阳性免疫产物为棕褐色颗粒状或点状，在海马 CA1 区的神经元中以胞体核周质表达尤为明显，经观察分析发现，丙泊酚处理后大鼠脑内神经元中 pCaMKⅡ 表达相较于正常对照组明显降低。对各组大鼠的脑片进行定量分析，结果表明：正常对

照组、丙泊酚组、丙泊酚+皮质酮组的 pCaMK II 平均灰度值分别为  $105.88 \pm 11.65$ 、 $131.82 \pm 7.14$  ( $P < 0.05$ , 与正常对照组相比)、 $141.20 \pm 9.42$  ( $P < 0.05$ , 与正常对照组、丙泊酚组相比); 3 组之间具有显著性差异, 与正常对照组相比, 丙泊酚组表达水平降低, 丙泊酚+皮质酮组 pCaMK II 表达最低。结果见图 1。

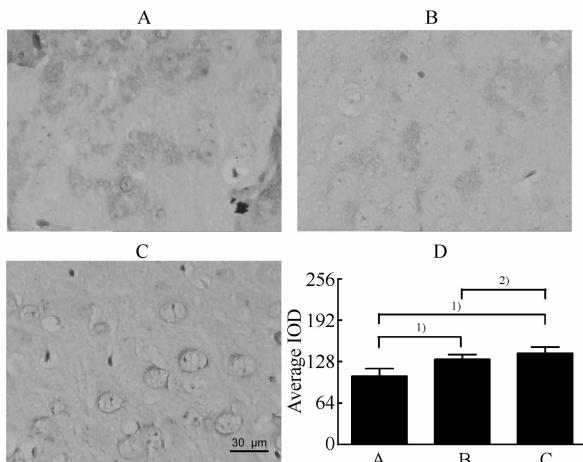


图 1 各组大鼠海马 CA1 区 pCaMK II 免疫组织化学染色 ( $n=6$ ,  $400\times$ )

A—正常对照组; B—丙泊酚组; C—丙泊酚+皮质酮组; D—大鼠脑片免疫反应的平均灰度值统计结果; 与正常对照组相比,  $^1P < 0.05$ ; 与丙泊酚组相比,  $^2P < 0.05$

**Fig 1** Expression of pCaMK II in hippocampal CA1 area by immunohistochemical method( $n=6$ ,  $400\times$ )

A—control group; B—propofol group; C—propofol+corticosterone group; D—analysis results of average gray of the immunohistochemical staining; compared with control group,  $^1P < 0.05$ ; compared with propofol group,  $^2P < 0.05$

### 3.2 电镜实验结果

电镜下观察到: 正常对照组大鼠海马内神经元细胞结构正常, 细胞核大而圆, 核仁明显, 染色质密度均匀; 线粒体丰富, 线粒体嵴呈清晰的板层状排列; 核周可见大量粗面内质网, 其表面附着核糖体, 胞质中还有大量游离核糖体。经  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  丙泊酚处理后, 大鼠海马内神经元细胞水肿, 核染色质减少, 核呈空泡状; 线粒体肿胀, 嵴融合, 线粒体有空泡状改变; 粗面内质网减少、肿胀, 部分核糖体脱颗粒。当  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  丙泊酚与  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  皮质酮联用后, 大鼠海马 CA1 区出现神经元核固缩、染色质边集、核膜部分溶解等病理现象, 同时核旁线粒体减少、线粒体嵴大量融合或空泡化, 并有粗面内质网肿胀、核糖体脱落、部分核糖体解聚等现象。结果见图 2。

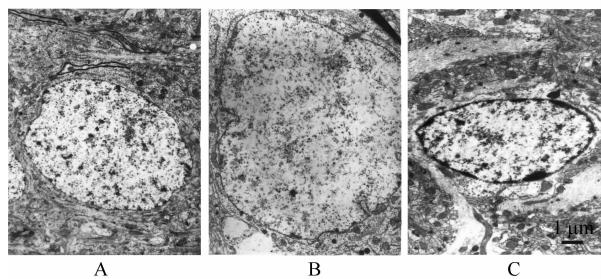


图 2 各组大鼠海马 CA1 区神经元超微结构分析( $38\,000\times$ )  
A—正常对照组; B—丙泊酚组; C—丙泊酚+皮质酮组

**Fig 2** Ultrastructure analysis of hippocampal neurons in the CA1 region of each group( $38\,000\times$ )

A—control group; B—propofol group; C—propofol+corticosterone group

### 4 讨论

$\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Calcium/calmodulin dependent kinase II, CaMK II) 是突触后致密区的重要组成部分, 占突触后致密区总量 30%~50%, 当其激活后发生磷酸化修饰, 对学习记忆、基因表达及神经元的可塑性都会起重要的作用<sup>[5-6]</sup>。作为神经系统中一个重要的信号转导蛋白, CaMK II 可在其 286 氨基酸位点的苏氨酸上发生自身磷酸化, 形成 pCaMK II, 可进一步使 CREB 等核转录因子磷酸化, 使下游信号持续激活。用胚胎干细胞基因打靶技术处理后, 缺乏 CaMK II 亚单位的小鼠, 空间学习记忆能力降低, 其海马脑片上 LTP 的诱导受到抑制<sup>[8]</sup>。药理学实验也证明, CaMK II 的非竞争性抑制剂可以减少 CA1 区的突触传递<sup>[7]</sup>。本实验中, B 组大鼠接受多次腹腔注射  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  丙泊酚后, pCaMK II 的表达下调 ( $P < 0.05$ ), 而丙泊酚+皮质酮组大鼠脑内的 pCaMK II 表达的下调程度加剧 ( $P < 0.05$ ), 说明  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  丙泊酚与  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  皮质酮复合应用, 进一步抑制了 pCaMK II 的表达, 提示了丙泊酚及皮质酮对基因转录的可能调节作用, 这为丙泊酚所致的学习记忆障碍提供了可能的分子机制。与上述实验结果相印证的是, O’Gorman 等在被动回避实验中发现, 麻醉剂量的丙泊酚可以使大鼠产生逆行性遗忘作用<sup>[9]</sup>。

同时有研究发现, 丙泊酚促进神经细胞凋亡, 抑制脑内海马神经元的发育<sup>[10-11]</sup>。本实验利用超微病理学观察方法可见丙泊酚组和丙泊酚+皮质酮组反复使用丙泊酚或与皮质酮联用均造成神经元及细胞器不同程度受损(图 2), 提示了丙泊酚与皮质酮长期使用对神经系统发育的不利影响。中

枢神经系统的能量供应与线粒体的功能有关，线粒体形态的改变会导致神经元能量代谢障碍，而粗面内质网脱颗粒意味着内质网表面附着核糖体减少，细胞合成蛋白质也将减少<sup>[12]</sup>。本实验观察到，大鼠在连续多次接受丙泊酚注射后，神经元内的线粒体和内质网均出现不同程度的病理性损伤变化(图2)，提示其脑内神经元的能量代谢和蛋白质合成障碍。此外，当丙泊酚+皮质酮组的丙泊酚与皮质酮联用后，大鼠脑内的神经元还存在染色质边集、核固缩等病理变化，这是细胞经受不可逆损害后细胞死亡的早期现象。以上病理改变说明丙泊酚与皮质酮连续多次复合使用对神经细胞结构形成了损伤，而且也可能是导致发育中大鼠学习记忆障碍的潜在原因。

综上所述， $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 丙泊酚与 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 皮质酮连续使用8 d，降低大鼠海马 pCaMK II 表达，损伤神经元结构，对大鼠神经系统的发育具有不利作用。

## REFERENCES

- [1] ZHU G Q, YANG L J, YOU K Z. Influence of Circadian Rhythm on depth of propofol anesthesia [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(11): 1239-1242.
- [2] GAO X X, CHEN X Q, ZHANG H F, et al. Influence of propofol anesthesia in serum IL-2 and IL-6 levels of patients with biliary tract surgery [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(6): 687-690.
- [3] BARR G, ANDERSON RE, OWALL A, et al. Being awake intermittently during propofol-induced hypnosis: a study of BIS, explicit and implicit memory [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2001, 45(7): 834-838.
- [4] TAN G H, YANG B N, LIANG B O, et al. Changes in the proliferative activity of hippocampal neural stem cells from manganismus mice [J]. Neural Regen Res, 2007, 2(4): 193-197.
- [5] FRANKLAND P W, O'BRIEN C, OHNO M, et al. Alpha-CaMK II -dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory [J]. Nature, 2001, 4(11): 309-313.
- [6] WAYMAN G A, LEE Y S, TOKUMITSU H, et al. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity [J]. Neuron, 2008, 59(6): 914-931.
- [7] MCLAY R N, FREEMAN S M, ZADINA J E. Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze [J]. Physiol Behav, 1998, 3(6): 525-530.
- [8] SANHUESA M, MCINTYRE C C, LISMAN J E. Reversal of synaptic memory by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor [J]. J Neurosci, 2007, 27(19): 5190-5199.
- [9] TINSLEY C J, NARDUZZO K E, HO J W, et al. A role for calcium-calmodulin-dependent protein kinase II in the consolidation of visual object recognition memory [J]. Eur J Neurosci, 2009, 30(6): 1128-1139.
- [10] TU S, WANG X, YANG F, et al. Propofol induces neuronal apoptosis in infant rat brain under hypoxic conditions [J]. Brain Res Bull, 2011, 86(1/2): 29-35.
- [11] PEARL M L, HU Y, NIESMAN I R, et al. Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation [J]. Anesthesiology, 2012, 116(2): 352-356.
- [12] CHEN H, CHAN D C. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics [J]. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18(4): 453-459.

收稿日期：2013-05-21

## 心得宁口服液对大鼠慢性心衰模型的影响

赵京生，易伟国，刘弘(解放军第152中心医院，河南 平顶山 467000)

**摘要：**目的 观察心得宁口服液对大鼠慢性心衰模型心脏动力学和血清脑钠肽(BNP)、肌钙蛋白I(cTnI)、乳酸脱氢酶(LDH)水平及左心室指数、全心指数的影响。方法 60只大鼠随机分为5组，分别为模型组、假手术组和高、中、低浓度的心得宁口服液组，并设阳性对照组(灌服芪苈强心胶囊混悬液)。假手术组及模型组均灌服同体积生理盐水，连续给药6周后，测定各组大鼠心脏动力学变化，血清BNP、cTnI、LDH水平及左心室指数、全心指数。结果 慢性心衰模型造模成功。与模型组比较，中剂量心得宁口服液组可明显升高心脏HR水平( $P<0.05$ )，高、中剂量心得宁口服液组可明显升高心脏LVSP水平( $P<0.05$ )，各给药组均有降低心脏LVEDP水平、升高心脏左心室内压变化速率的趋势( $P>0.05$ )。中、低剂量心得宁口服液组可明显降低血清BNP水平( $P<0.05$ )；高剂量心得宁口服液组可明显降低血清cTnI水平( $P<0.05$ )，各给药组可显著降低血清LDH水平( $P<0.01$ )，中剂量心得宁口服液组可显著降低左心室指数、全心指数( $P<0.01$ )，低剂量心得宁口服液组可明显降低左心室指数( $P<0.05$ )。结论 心得宁口服液具有明显改善大鼠慢性心衰模型的作用。

**关键词：**心得宁口服液；大鼠；慢性心衰模型；芪苈强心胶囊

**中图分类号：**R285.5      **文献标志码：**A      **文章编号：**1007-7693(2014)04-0412-05

**DOI：**10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.007

作者简介：赵京生，男，主任医师    Tel: 15093850999    E-mail: zxj15093850999@126.com