

· 实验研究 ·

氯胺酮下调神经连接蛋白-1 在创伤后应激功能障碍动物模型中的作用

罗丹 廖燕凌 邱丽丽 纪木火 杨建军

【摘要】 目的 观察氯胺酮是否可改善创伤后应激功能障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)症状及可能涉及的机制。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 60 只, 6~8 周龄, 随机分为四组: 对照+生理盐水组(CN 组)、对照+氯胺酮组(CK 组)、PTSD+生理盐水组(PN 组)、PTSD+氯胺酮组(PK 组), 每组 15 只。采用幽闭+足底电击法(IFS)建立 PTSD 模型。建模 30 min 后腹腔注射氯胺酮 2.5 mg/kg, 连续注射 14 d。在建模后第 14 天, 每组取 12 只大鼠开始行条件性恐惧实验和水迷宫实验; 另外 3 只取海马组织, 采用 Western blot 法检测神经连接蛋白-1(neurexin-1, NLGN-1)含量。**结果** 条件性恐惧实验中, PN 组僵直反应时间占总时间百分比明显高于 CN 组和 PK 组($P<0.01$)。水迷宫实验中, 训练第 2、3、4、5 天 PN 组的逃避潜伏期明显长于 CN 组($P<0.05$); 训练第 2、4、5 天 PK 组的逃避潜伏期明显短于 PN 组($P<0.05$)。PN 组海马内 NLGN-1 含量明显高于 CN 组和 PK 组($P<0.05$)。**结论** PTSD 模型大鼠出现明显的恐惧记忆增强及海马相关的空间学习障碍, 可能与海马中 NLGN-1 含量明显增加有关, 氯胺酮可能通过降低海马中 NLGN-1 表达而减弱 PTSD 大鼠的恐惧记忆及提高海马相关的空间学习能力。

【关键词】 PTSD; 氯胺酮; 认知功能; 神经连接蛋白-1

Role of ketamine-mediated-decreased expression of neuroligin-1 in the hippocampus on rats with post-traumatic stress disorder LUO Dan, LIAO Yanling, QIU Lili, JI Muhuo, YANG Jianjun. Department of Anesthesiology, Medical School of Nanjing University, Nanjing General Hospital, Nanjing 210002, China

Corresponding author: YANG Jianjun, Email: jianjunyang1971@163.com

【Abstract】 Objective To observe whether ketamine improves the symptoms of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Methods** Sixty male SD rats were randomized into four groups: groups CN, CK, PN and PK, 15 in each. PTSD animal model was established by inescapable foot shock (IFS) procedure. In groups PK and CK, rats were treated with ketamine 2.5 mg/kg by intraperitoneal injection beginning at 30 min after the IFS procedure once a day for 14 days. Twelve rats were used for behavioral tests, and the others were sacrificed to collect hippocampus tissues for Western blot in each group 14 d after IFS procedure, respectively. The expression of neuroligin (NLGN)-1 was detected by Western blot. **Results** In the fear conditioning test, compared with group CN, the percent age of freezing time in total time in group PN was significantly increased ($P<0.01$). Compared with group PN, the percent age of freezing time in PK group was significantly decreased ($P<0.01$). In the water maze test, compared with group CN, the escape latency of group PN was significantly increased on day 2, 3, 4, 5 of training period ($P<0.05$). Compared with group PN, the escape latency of group PK was significantly decreased on day 2, 4, 5 of training period ($P<0.05$). There was no significant difference in the time spent in the target quadrant. The expression of NLGN-1 in the hippocampus was significantly increased in PN group compared with group CN ($P<0.05$); compared with group PN, the expression of NLGN-1 in the hippocampus was significantly decreased in PK group ($P<0.05$). **Conclusion** The study suggest that the fear memory is significantly, increased and the hippocampus-dependent spatial learning capacity is impaired in the PTSD model rats. And the increased expression of hippocampal NLGN-1 may be involved in the development of PTSD. Ketamine mediated down-regulation of NLGN-1 in the hippocampus might contribute to attenuating the fear memory and improving the hippocampus-dependent spatial learning in the PTSD model rats.

DOI:10.12089/jca.2018.01.019

基金项目:国家自然科学基金(81471105);东南大学-南京医科大学合作研究重点项目(2242017K3DN05)

作者单位:210002 南京大学医学院 南京总医院麻醉科(罗丹、廖燕凌);东南大学附属中大医院麻醉科(邱丽丽、纪木火、杨建军)

通信作者:杨建军, Email: jianjunyang1971@163.com

【Key words】 Post-traumatic stress disorder; Ketamine; Hippocampus; Neuroligin-1

创伤后应激功能障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)是指个体在遭受到创伤经历之后所导致的神经精神疾病。在平常生活中, PTSD 的发生率为 6%~8%, 但是经历严重创伤之后 PTSD 的发生率会提高至 20%~30%^[1]。根据最新美国精神病学会的《精神障碍诊断与统计手册》的定义, PTSD 主要有以下 3 个临床特征:(1)不断重复体验创伤经历;(2)逃避任何与创伤事件相关的人和事物;(3)处于高度应激状态^[2]。PTSD 患者都有明显的海马体积缩小以及神经元数量减少, 且各脑区变化程度与 PTSD 症状的严重程度相关^[3~6], 提示中枢神经系统的改变涉及 PTSD 的病理生理机制。目前 PTSD 缺乏特异性治疗, 主要采用抗抑郁及结合部分抗焦虑的药物治疗方法, 但治疗效果不佳。因此研究 PTSD 新的治疗药物以及其中的机制对 PTSD 防治有重要意义。

材料与方法

实验动物与分组 本研究方案已经过南京大学附属金陵医院伦理委员会批准, 雄性 SD 大鼠 60 只, 6~8 周龄, 体重 250~275 g, 由南京大学附属金陵医院动物实验中心提供。大鼠从出生至实验开始前都在室温约 24℃, 湿度约 45% 的动物房中饲养, 自由饮食。采用随机数字法分为四组: 对照+生理盐水组(CN 组)、对照+氯胺酮组(CK 组)、PTSD+生理盐水组(PN 组)、PTSD+氯胺酮组(PK 组), 每组 15 只。

PTSD 模型建立 SD 大鼠适应实验环境 1 周后, 通过幽闭+足底电击(IFS)建立 PTSD 动物模型。建模方法如下: 将大鼠放置至一幽闭环境(40 cm×40 cm×100 cm)适应 5 min, 随后的 15 min 内, 首先给予声音(2 000 Hz, 75 dB)刺激 30 s, 再随机给予 10 次电刺激(1 mA, 6 s)。建模结束后, 每只大鼠被放回饲养笼中。对照组大鼠也会放入该幽闭环境中 20 min, 给予相同的声音刺激, 但不给予电刺激, 之后也返回饲养笼。每只大鼠建模完成之后, 用 75% 酒精擦拭仪器, 以消除动物残留气味对建模的影响。

药物给予 CK 和 PK 组于建模 30 min 后腹腔注射氯胺酮 2.5 mg/kg, CN 和 PN 组腹腔注射等量生理盐水。连续注射 14 d。

条件性恐惧实验 在建模后第 14 天, 每组取

12 只大鼠, 开始行条件性恐惧实验和水迷宫实验。通过将大鼠放入幽闭环境(PTSD 建模环境)5 min, 给予 30 s 声音(2 000 Hz, 75 dB)刺激, 通过图像自动监视系统(XR-XC404)记录大鼠的僵直反应(除呼吸外, 无任何其他运动)时间。通过僵直反应时间与每只大鼠总实验时间的百分比值, 来反映大鼠的恐惧记忆强弱情况。

水迷宫实验 将一直径 150 cm、高 60 cm 的不锈钢圆形水池等分为 4 个象限。选定 1 个目标象限, 将一直径 10 cm 的圆形平台放入目标象限的中央。实验前, 放水至水池中, 以水平面高于平台 1~2 cm 为宜, 水温约 23℃。在建模后第 14 天开始进行 5 d 的训练。每只大鼠分别从 4 个象限放入水池中, 记录大鼠找到平台的时间为逃避潜伏期。若大鼠超过 2 min 还未找到平台, 则认为寻找平台失败, 记录潜伏期为 120 s, 并帮助大鼠找到平台, 在平台上停留 15 s。训练 5 d 后进行水迷宫测试。将目标平台撤去, 从目标象限的对侧象限放入大鼠, 通过图像自动监视系统(XR-XM101)记录 60 s 的大鼠空间探索轨迹, 计算大鼠探索目标象限时间百分比。

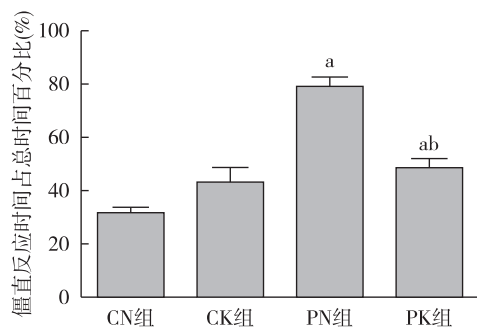
Western blot 检测 在建模后第 14 天, 处死每组剩余的 3 只大鼠, 取海马组织, 采用 Western blot 法检测神经连接蛋白-1(neuroligin-1, NLGN-1)的含量。取海马组织, 用冷 PBS 洗去血污 2~3 次, 置于匀浆器中, 加入 10 倍组织体积本试剂磷酸缓冲液(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂)冰上彻底匀浆。用微量加样枪将匀浆液转移至 1.5 ml EP 管中, 冰浴 30 min 并用移液器反复吹打。4℃ 下 12 000 rpm 离心 10 min, 取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 95℃ 金属浴煮 5 min。凝胶电泳分离, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入稀释一抗, 4℃ 过夜, 次日用 TBST 洗 3 次, 加二抗室温下孵 30 min, TBST 脱色, 底物显色反应、显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带相对表达。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)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

PN 组僵直反应时间占总时间百分比明显高于 CN 和 PK 组($P < 0.05$), PK 组僵直反应时间占总

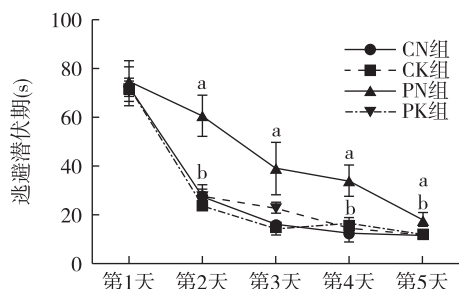
时间百分比明显高于 CN 组 ($P < 0.05$), CN、CK 组僵直反应时间占总时间百分比差异无统计学意义 (图 1)。



注:与 CN 组比较, ^a $P < 0.05$;与 PN 组比较, ^b $P < 0.05$

图 1 四组大鼠僵直反应时间占总时间百分比的比较

训练第 2、3、4、5 天 PN 组逃避潜伏期明显长于 CN 组 ($P < 0.05$)。训练第 2、4、5 天 PN 组逃避潜伏期明显长于 PK 组 ($P < 0.05$), CN 组和 CK 组逃避潜伏期差异无统计学意义 (图 2)。



注:与 CN 组比较, ^a $P < 0.05$;与 PN 组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 四组大鼠水迷宫训练逃避潜伏期的比较

水迷宫测试阶段,各组的探索目标象限时间差异并无统计学意义,但与 CN 组比较,PN 组有缩短趋势;与 PN 组比较,PK 组有延长趋势 (图 3)。

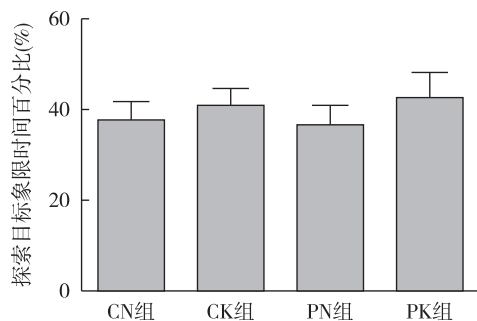
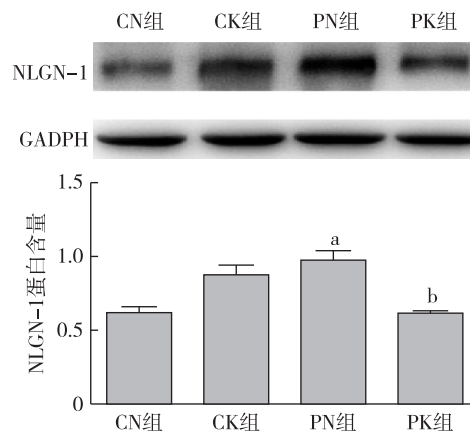


图 3 四组大鼠水迷宫测试探索目标象限时间百分比的比较

PN 组海马内 NLGN-1 含量明显高于 CN 组和

PK 组 ($P < 0.05$), CN、CK 组海马内 NLGN-1 差异无统计学意义 (图 4)。



注:与 CN 组比较, ^a $P < 0.05$;与 PN 组比较, ^b $P < 0.05$

图 4 四组大鼠海马内 NLGN-1 含量的比较

讨 论

本研究结果显示,PN 组在条件性恐惧实验中的僵直反应时间占总时间百分比明显增加,表明 PTSD 模型建立成功。在水迷宫训练中,PN 组表现出明显的空间学习障碍。虽然在水迷宫测试时,各组探索目标象限时间百分比并没有明显的差异,但 PN 组大鼠的探索目标象限时间有下降趋势,同时该时期的海马 NLGN-1 蛋白含量明显增加。

神经连接蛋白 (neuroligins, NLGNs) 是位于突触后膜的跨膜蛋白。NLGNs 可跨突触与突触前轴突蛋白 (neurexins, NRXNs) 相结合,同时胞内可与突触后的特异性蛋白结合,起着传递突触信息,调控突触分化的功能。NLGN-1 主要位于兴奋性突触上,可调控兴奋性突触的发生发展及兴奋性突触信号传递^[7]。

有研究表明在海马中过表达 NLGN-1 会导致学习障碍同时损伤突触可塑性^[8]。在抑郁症动物模型中海马以及前额叶皮层的 NLGN-1 表达明显增加^[9]。在短暂性脑缺血动物模型中也有报道 NRX-NLGN-1-PSD-95 信号通路的表达增加,并且认为这条信号通路的高表达意味着脑损伤^[10]。另外, NLGN-1 也涉及其他多种神经精神疾病的病理生理过程,例如自闭症、阿尔兹海默病等^[11,12]。因此,我们推测 NLGN-1 可能也涉及 PTSD 的病理生理过程。并且本研究已经证实 PTSD 大鼠的海马组织中 NLGN-1 的表达水平明显增高。

氯胺酮是非竞争性的 NMDAR 拮抗剂,具有抗

焦虑,抗抑郁的作用。有报道指出,用过氯胺酮治疗的患者比没有用过氯胺酮治疗的患者患 PTSD 的概率低^[13]。因此,氯胺酮有望成为新的 PTSD 的防治药物。本研究给予氯胺酮后可明显减低 PTSD 大鼠的恐惧记忆及提高海马相关的空间学习能力,同时降低 PTSD 大鼠海马 NLGN-1 的表达。

综上所述,本研究结果显示 PTSD 模型大鼠出现明显的恐惧记忆增强及海马相关的空间学习障碍,可能与海马中 NLGN-1 含量明显增加有关,而氯胺酮可能通过降低海马中 NLGN-1 表达而减弱 PTSD 大鼠的恐惧记忆及提高海马相关的空间学习能力。这为研究 PTSD 的病理生理机制及氯胺酮的治疗提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] Desmedt A, Marighetto A, Piazza PV. Abnormal fear memory as a model for posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 2015, 78(5): 290-297.
- [2] Diagnostik P. Desk reference to the diagnostic criteria from DSM-5. *Psych Up2date*, 2014, 8(1): 7.
- [3] Wang Z, Neylan TC, Mueller SG, et al. Magnetic resonance imaging of hippocampal subfields in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 2010, 67(3): 296-303.
- [4] Karl A, Werner A. The use of proton magnetic resonance spectroscopy in PTSD research—meta-analyses of findings and methodological review. *Neurosci Biobehav Rev*, 2010, 34(1): 7-22.
- [5] Karl A, Schaefer M, Malta LS, et al. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. *Neurosci Biobehav Rev*, 2006, 30(7): 1004-1031.
- [6] Sekiguchi A, Sugiura M, Taki Y, et al. Brain structural changes as vulnerability factors and acquired signs of post-earthquake stress. *Mol Psychiatry*, 2013, 18(5): 618-623.
- [7] Südhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 2008, 455(7215): 903-911.
- [8] Feng P, Akladios AA, Hu Y. Hippocampal and motor fronto-cortical neuroligin1 is increased in an animal model of depression. *Psychiatry Res*, 2016, 243: 210-218.
- [9] Li C, Han D, Zhang F, et al. Preconditioning ischemia attenuates increased neurexin-neuroligin1-PSD-95 interaction after transient cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 2007, 426(3): 192-197.
- [10] Juven-Wetzler A, Cohen H, Kaplan Z, et al. Immediate ketamine treatment does not prevent posttraumatic stress responses in an animal model for PTSD. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(3): 469-479.
- [11] Millson A, Lagrave D, Willis MJ, et al. Chromosomal loss of 3q26.3-3q26.32, involving a partial neuroligin 1 deletion, identified by genomic microarray in a child with microcephaly, seizure disorder, and severe intellectual disability. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(1): 159-165.
- [12] Tristán-Clavijo E, Camacho-García RJ, Robles-Lanuza E, et al. A truncating mutation in Alzheimer's disease inactivates neuroligin-1 synaptic function. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(12): 3171-3175.
- [13] Zhang LM, Zhou WW, Ji YJ, et al. Anxiolytic effects of ketamine in animal models of posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, 2015, 232(4): 663-672.

(收稿日期:2017-05-11)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》对来稿署名的要求

作者姓名在文题下方按序排列,一般不宜超过 6 位。排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作更换,如欲更换第一作者,需出具单位证明和由全体作者签名的申请。作者单位的邮编、所在城市、单位名称的简称和科室在首页脚注中说明。若其他作者不属同一单位,需写出各自单位,并在单位后用括号列出作者的姓名。作者应具备的条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析和解释;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术上进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。“通信作者”系指研究生课题论文的导师或直接指导者、相关科研项目课题负责人及该文的主要责任者和联系者。“通信作者”对论文应具有与第一作者同等的权利和义务。