

· 实验研究 ·

氯胺酮对新生大鼠海马区 G 蛋白偶联受体 30 表达的影响

李建立 尚瑞媛 刘妹女 何金华 蔚冬冬 容俊芳

【摘要】 目的 探讨氯胺酮对新生大鼠海马区 G 蛋白偶联受体 30 (G protein-coupled receptor 30, GPR30) 表达的影响。**方法** 实验一: 随机选取 20 只健康雄性 SD 大鼠作为空白对照组 (S 组, $n=20$), 在饲养 1、3、7、14 d 时各取出 5 只处死, 采用免疫组化法检测大鼠海马区 GPR30 阳性细胞数。实验二: 10 只出生 7 d 健康雄性 SD 大鼠随机分为两组, 生理盐水组 (C 组, $n=5$) 和氯胺酮组 (K 组, $n=5$)。连续 3 d 腹腔注射生理盐水 0.1 ml (C 组) 或氯胺酮 75 mg/kg (K 组), 在末次给药后 24 h 处死, 采用免疫组化法检测大鼠海马区 cleaved caspase-3 阳性细胞数, 采用 Western blot 法检测海马区 GPR30 蛋白含量。**结果** 与 1 d 和 3 d 比较, 7 d 和 14 d S 组大鼠海马区 GPR30 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$); 与 7 d 比较, 14 d 时 S 组大鼠海马区 GPR30 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$)。与 C 组比较, K 组海马区 cleaved caspase-3 阳性细胞数明显增多, GPR30 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。**结论** 氯胺酮诱导发育期大鼠海马细胞凋亡可能与 GPR30 表达下调有关。

【关键词】 氯胺酮; G 蛋白偶联受体 30; 新生大鼠; 发育期大脑; 海马; 细胞凋亡

Effect of ketamine on the expression of G protein-coupled receptor 30 in hippocampus of neonatal rats LI Jianli, SHANG Ruiyuan, LIU Meinv, HE Jinhua, YU Dongdong, RONG Junfang. Department of Anesthesiology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China
Corresponding author: RONG Junfang, Email: rjf13291@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ketamine on the expression of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in hippocampus of neonatal rats. **Methods** Step 1: 20 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly selected as blank control group (group S, $n=20$), five rats were taken out at 1, 3, 7 and 14 days of feeding, the number of positive cells of GPR30 in the hippocampus of rats was detected by immunohistochemistry. Step 2: 10 7-day-old healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: saline group (group C, $n=5$) and ketamine group (group K, $n=5$). Three days after intravenous injection of 0.1 ml (group C) or ketamine 75 mg/kg (group K), the rats were sacrificed at 24 h after the last administration. The expression of cleaved caspase-3 in hippocampus of rats was detected by immunohistochemistry and the expression of GPR30 in hippocampus was detected by Western blot. **Results** Compared with 1 d and 3 d of group S, the expression of GPR30 in hippocampus of 7 d and 14 d rats was significantly increased ($P<0.05$). Compared with 7 d of group S, the expression of GPR30 in hippocampus of 14 d rats was significantly increased ($P<0.05$). The levels of cleaved caspase-3 in hippocampus were significantly higher and the levels of GPR30 in hippocampus were significantly lower in group K than in group C ($P<0.05$). **Conclusion** Ketamine induces hippocampus cell apoptosis in the developing rat brain, which is associated with the decrease level of GPR30.

【Key words】 Ketamine; GPR30; Neonatal rats; Developing brain; Hippocampus; Cell apoptosis

婴幼儿大脑处于脑生长爆发期, 大量研究表明氯胺酮可致发育期大脑神经细胞凋亡^[1-3], 甚至导致远期学习记忆功能及行为异常^[4-5]。17 β -雌二醇作为神经保护作用的甾体物质, 可减轻脑损伤。我们前期研究结果显示, 氯胺酮可致发育期大鼠大脑

17 β -雌二醇表达下调, 给予 17 β -雌二醇可显著改善氯胺酮引起的发育期大鼠大脑皮层区神经细胞凋亡^[6]。G 蛋白偶联受体 30 (G protein-coupled receptor 30, GPR30) 是雌激素膜受体, 阿尔兹海默病、帕金森病和多发性硬化症等神经疾病导致的神经细胞损伤与 GPR30 表达下调有关^[7-9]。氯胺酮致海马细胞凋亡是否与 GPR30 表达变化有关目前尚无定论。本研究观察氯胺酮对新生大鼠海马区 GPR30 表达的影响, 探讨氯胺酮引起发育期神经毒性的可能机制。

DOI: 10.12089/jca.2019.12.018

基金项目: 河北省自然科学基金 (H2017307013)

作者单位: 050051 石家庄市, 河北省人民医院麻醉科 (李建立、刘妹女、何金华、蔚冬冬、容俊芳); 河北医科大学研究生院 (尚瑞媛)

通信作者: 容俊芳, Email: rjf13291@163.com

材料与方法

实验材料与动物 氯胺酮(批号:H35020148),兔抗 GPR30 多克隆抗体(批号:ab39742),兔抗 cleaved caspase-3 抗体(批号:AF7022)。新生 24 h 的健康清洁级雄性 SD 大鼠 30 只,由河北医科大学实验动物中心提供的清洁级雌鼠及雄鼠交配后产生。

实验一:

分组与处理 随机选取 20 只健康雄性 SD 大鼠作为空白对照组(S 组, $n=20$),在饲养 1、3、7、14 d 时各取出 5 只处死,采用免疫组化法检测大鼠海马区 GPR30 阳性细胞数。

实验二:

分组与处理 10 只出生 7 d 健康雄性 SD 大鼠随机分为两组,生理盐水组(C 组, $n=5$)和氯胺酮组(K 组, $n=5$)。连续 3 d 腹腔注射生理盐水 0.1 ml (C 组)或氯胺酮 75 mg/kg (K 组),在末次给药后 24 h 处死。每次给药后将大鼠置于恒温箱中并持续低流量给氧 2 L/min,严格观察大鼠呼吸频率及皮肤黏膜颜色,待翻正反射恢复后,放回母鼠身边(与母鼠分离时间不超过 5 h)。采用免疫组化法检测大鼠海马区 cleaved caspase-3 阳性细胞数,采用 Western blot 法检测海马区 GPR30 蛋白含量。

cleaved caspase-3 和 GPR30 阳性细胞计数 腹腔注射 1%戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉 SD 大鼠,4%多聚甲醛心脏灌注后立即断头,于冰上分离整个脑组织并立即置于 4%多聚甲醛溶液中固定 48 h,常规石蜡切片。将切片常规脱蜡水化,枸橼酸盐修复液高压修复 50 min,3% H_2O_2 甲醇避光孵育 10 min,10%山羊血清 37℃ 孵育 40 min,然后加入兔抗 cleaved caspase-3 一抗(1:100)和兔抗 GPR30 一抗(1:400),于 4℃ 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色。待细胞着色而背底颜色较淡时,蒸馏水终止显色。苏木素染色 1 min,盐酸乙醇分化 1~2 s,脱水封片。cleaved caspase-3 阳性表达的判断标准:海马细胞的细胞核染成棕色。GPR30 阳性表达的判断标准:海马细胞的细胞膜染成棕色。高倍镜下随机观察 5 个视野,采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件进行阳性细胞计数并取平均值。

GPR30 蛋白含量检测 C 组和 K 组在末次给药 24 h 后,腹腔注射 1%戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后断头并立即于冰上取两侧海马组织,放于液氮

中,称重后使用相应剂量的细胞裂解液裂解细胞以提取蛋白,BCA 法检测样品蛋白含量。取待测蛋白 50 μ g 加上样缓冲液煮沸变性,配胶上样后,100 V 电压电泳约 30 min,待 Marker 条带跑开后 120 V 电压继续电泳约 1 h。转膜后,5%脱脂牛奶 TBST 液封闭 3 h,加入兔抗 GPR30 一抗(1:1 000),4℃ 孵育过夜, TBST 清洗后加入羊抗兔二抗(1:1 000),室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤后暗室发光。通过图像处理软件对蛋白条带进行分析,以 GPR30 蛋白条带灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值反映 GPR30 蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析。组间比较采用成组 t 检验,不同时点比较采用重复测量方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

GPR30 阳性细胞数 S 组大鼠 1 d 和 3 d 海马区 GPR30 阳性细胞数差异无统计学意义。与 1 d 和 3 d 比较,7 d 和 14 d 时 S 组大鼠海马区 GPR30 阳性细胞数明显增多($P<0.05$)。与 7 d 比较,14 d 时 S 组大鼠海马区 GPR30 阳性细胞数明显增多($P<0.05$) (图 1)。

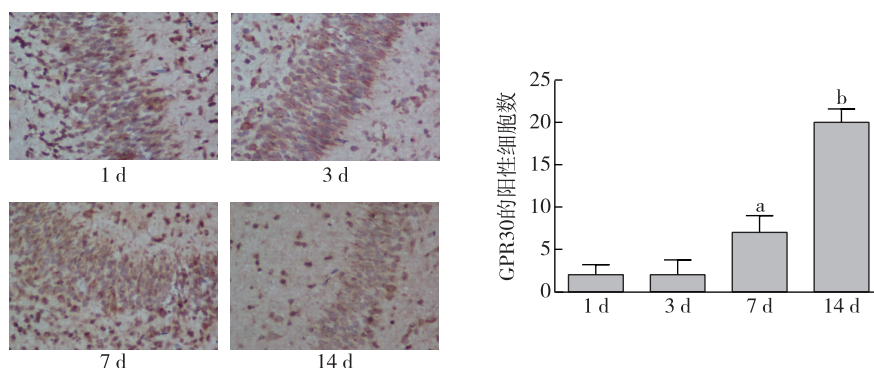
cleaved caspase-3 阳性细胞数 与 C 组比较, K 组海马区 cleaved caspase-3 阳性细胞数明显增多($P<0.05$) (图 2)。

GPR30 蛋白含量 与 C 组比较, K 组海马区 GPR30 蛋白含量明显减少($P<0.05$) (图 3)。

讨 论

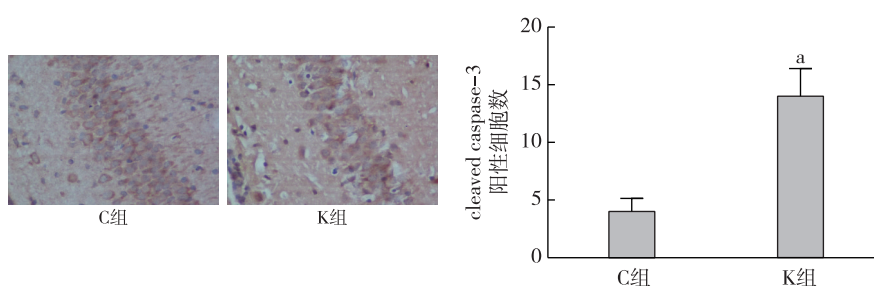
7 日龄大鼠脑发育阶段相当于人类的婴幼儿期,是中枢神经系统发育和突触形成的关键时期。氯胺酮作为 NMDA 受体非竞争性拮抗药,因起效快、作用时间短、镇痛作用强而普遍应用于小儿麻醉。研究表明,氯胺酮可抑制神经元树突或轴突的生长导致大量神经细胞凋亡^[10-13],因此氯胺酮在婴幼儿中的临床作用引起了广泛关注。参考相关文献^[6],本实验选择饲养至 7 d 大鼠给予氯胺酮,采用连续 3 d 腹腔注射氯胺酮 75 mg/kg,制备出在快速发育期大剂量反复使用氯胺酮的实验动物模型,研究其对新生大鼠海马细胞凋亡的影响。整个实验过程中严格监测幼鼠的呼吸情况,同时给予低流量氧气(2 L/min)供应避免了因缺血、缺氧引起的神经细胞凋亡。

NMDA 受体是存在于中枢神经系统的正常兴奋



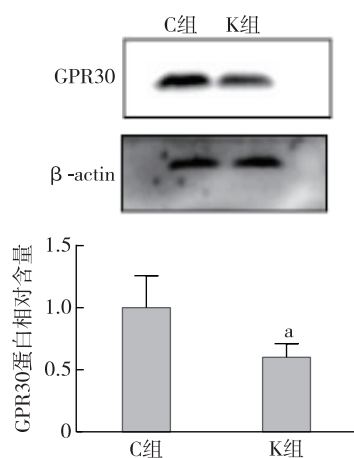
注:与 3 d 比较,^a $P < 0.05$;与 7 d 比较,^b $P < 0.05$

图 1 S 组大鼠不同发育期海马 GPR30 阳性细胞数的比较 (×400)



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$

图 2 C 组和 K 组大鼠海马区 cleaved caspase-3 阳性细胞数的比较 (×400)



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$

图 3 C 组和 K 组大鼠海马区 GPR30 蛋白相对含量的比较

性神经递质的谷氨酸受体,参与兴奋性突触传递、学习记忆及神经系统发育等多种生理过程。NMDA 受体活性调节的失衡可导致发育期大鼠神经元细胞发生广泛凋亡^[14]。氯胺酮作为 NMDA 受体拮抗剂,通过抑制兴奋性神经递质(包括乙酰胆碱、L-谷氨酸)发挥麻醉作用。在 Félix 等^[15]研究的斑马鱼胚胎模型中,实验结果显示氯胺酮可造成发育期大

脑神经细胞凋亡。caspase-3 是细胞凋亡过程的最终执行者,剪切后被激活,激活后的 caspase-3 可切割多种细胞内底物,引起超微结构的改变,导致细胞凋亡^[16]。本研究结果表明,氯胺酮可引起新生大鼠海马 cleaved caspase-3 表达上调,即导致海马细胞凋亡,与以往的研究结果一致^[17]。

雌二醇作为一种内源性神经活性甾体,在大脑发育过程中发挥着重要的调节作用,可促进神经元存活以及功能维护。雌二醇可通过与膜受体结合,快速激活下游信号通路,在大脑发育过程中发挥重要的调节作用,促进神经元存活以及功能维护。GPR30 作为雌激素膜受体,通过介导 17 β 雌二醇参与神经元的分化与成熟以及突触的形成。有研究表明,GPR30 不仅表达于海马 CA2 区,并且在 CA1、CA3 和齿状回细胞内也检测到了 GPR30 的表达^[18]。

雌二醇通过 GPR30 在体内病理生理效应中起决定性作用。有研究表明在去卵巢雌性大鼠模型中,GPR30 通过介导雌二醇促进大鼠的空间记忆能力^[19]。Gibbs 等^[20]研究显示膜受体 GPR30 在基底前脑胆碱能神经元上高表达,GPR30 的激活可增强

胆碱能神经元中乙酰胆碱的释放,提示膜受体 GPR30 能通过对海马树突棘和突触功能的直接或间接作用来调节海马区学习记忆能力和认知功能。有研究显示神经退行性变疾病(如阿尔兹海默症、帕金森病)导致的神经细胞凋亡与 GPR30 表达下调有关^[7,10],表明 GPR30 水平下降或缺乏会引起学习记忆功能障碍。本实验通过免疫组化法和 Western blot 法检测了氯胺酮对雌激素膜受体 GPR30 的表达变化,结果显示氯胺酮能显著下调新生大鼠海马区 GPR30 的表达。因此,GPR30 表达水平的降低可能与氯胺酮诱导的海马细胞损伤有关。

综上所述,氯胺酮致发育期大鼠海马细胞凋亡的机制可能与 GPR30 表达下调有关。本研究为氯胺酮诱导发育期大脑细胞凋亡的机制研究提供了实验参考依据。

参 考 文 献

- [1] Dong C, Rovnaghi CR, Anand KJ. Ketamine exposure during embryogenesis inhibits cellular proliferation in rat fetal cortical neurogenic regions. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2016, 60(5): 579-587.
- [2] Li W, Li H, Wei H, et al. 17 β -Estradiol treatment attenuates neurogenesis damage and improves behavior performance after ketamine exposure in neonatal rats. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13(251): 1-11.
- [3] Pancaro C, Segal BS, Sikes RW, et al. Dexmedetomidine and ketamine show distinct patterns of cell degeneration and apoptosis in the developing rat neonatal brain. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2016, 29(23): 3827-3833.
- [4] Huang H, Liu CM, Sun J, et al. Ketamine affects the neurogenesis of the hippocampal dentate gyrus in 7-day-old rats. *Neurotox Res*, 2016, 30(2): 185-198.
- [5] Nagy LR, Featherstone RE, Hahn CG, et al. Delayed emergence of behavioral and electrophysiological effects following juvenile ketamine exposure in mice. *Transl Psychiatry*, 2015, 5: e635.
- [6] Li J, Wang B, Wu H, et al. 17 β -estradiol attenuates ketamine induced neuroapoptosis and persistent cognitive deficits in the developing brain. *Brain Res*, 2014, 1593: 30-39.
- [7] Côté M, Bourque M, Poirier AA, et al. GPER1-mediated immunomodulation and neuroprotection in the myenteric plexus of a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2015, 82: 99-113.
- [8] Kubota T, Matsumoto H, Kirino Y. Ameliorative effect of membrane associated estrogen receptor G protein coupled receptor 30 activation on object recognition memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci*, 2016, 131(3): 219-222.
- [9] Alavi MS, Karimi G, Roohbakhsh A. The role of orphan G protein-coupled receptors in the pathophysiology of multiple sclerosis; a review. *Life Sci*, 2019, 224: 33-40.
- [10] Pancaro C, Segal BS, Sikes RW, et al. Dexmedetomidine and ketamine show distinct patterns of cell degeneration and apoptosis in the developing rat neonatal brain. *Matern Fetal Neonatal Med*, 2016, 29: 1-25.
- [11] Obradovic AL, Atluri N, Dalla Massara L, et al. Early exposure to ketamine impairs axonal pruning in developing mouse hippocampus. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(1): 164-172.
- [12] 李建立, 侯艳宁. 全身麻醉药对发育期大脑影响的研究进展. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(6): 610-613.
- [13] Warner DO, Zaccariello MJ, Katusic SK, et al. Neuropsychological and behavioral outcomes after exposure of young children to procedures requiring general anesthesia: the Mayo Anesthesia Safety in Kids (MASK) Study. *Anesthesiology*, 2018, 129(1): 89-105.
- [14] Sinner B, Friedrich O, Lindner R, et al. Long-term NMDA receptor inhibition affects NMDA receptor expression and alters glutamatergic activity in developing rat hippocampal neurons. *Toxicology*, 2015, 333: 147-155.
- [15] Félix LM, Vidal AM, Serafim C, et al. Ketamine induction of p53-dependent apoptosis and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 2018, 201: 730-739.
- [16] Erfani S, Khaksari M, Oryan S, et al. Nampt/PBEF/visfatin exerts neuroprotective effects against ischemia/reperfusion injury via modulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(1): 237-243.
- [17] Onalapo A, Ayeni O, Ogundeyi M, et al. Subchronic ketamine alters behaviour, metabolic indices and brain morphology in adolescent rats: involvement of oxidative stress, glutamate toxicity and caspase-3-mediated apoptosis. *J Chem Neuroanat*, 2019, 96: 22-33.
- [18] Tang H, Zhang Q, Yang L, et al. GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 387(1-2): 52-58.
- [19] Xu W, Cao J, Zhou Y, et al. GPR30 activation improves memory and facilitates DHPG-induced LTD in the hippocampal CA3 of middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2018, 149: 10-19.
- [20] Gibbs RB, Nelson D, Hammond R. Role of GPR30 in mediating estradiol effects on acetylcholine release in the hippocampus. *Horm Behav*, 2014, 66(2): 339-345.

(收稿日期:2018-12-23)