

· 实验研究 ·

远端肢体缺血预处理对氯胺酮致发育期大鼠海马 CA1 区神经细胞 Bcl-2 和 Bax 表达失衡的影响

刘颖 李安琪 马万 高宇博 邓立琴 张春 孟尽海

【摘要】 目的 研究远端肢体缺血预处理对氯胺酮麻醉导致的发育期大鼠海马 CA1 区神经细胞抗凋亡因子 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 和凋亡因子 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 表达失衡的影响。方法 SD 新生大鼠 48 只, 5 日龄, 体重 8~12 g, 随机分为四组: 对照组 (C 组) 于出生第 7 天腹腔注射生理盐水 8 ml/kg, 间隔 2 h 注射一次, 共注射 6 次; 远端肢体缺血预处理组 (RIPC 组) 于出生第 5 天行右后肢缺血 5 min, 再灌注 5 min 预处理, 4 个循环, 48 h 后腹腔注射生理盐水 8 ml/kg, 方法同 C 组; 氯胺酮组 (K 组) 于出生第 7 天腹腔注射氯胺酮 20 mg/kg, 方法同 C 组; 肢体缺血预处理+氯胺酮组 (RK 组) 于出生第 5 天行远端肢体缺血预处理, 48 h 后腹腔注射氯胺酮 20 mg/kg, 方法同 C 组。四组于腹腔注射完成后 12 h 经心脏灌注取脑, 分别采用免疫组化法和 Western blot 法观察大鼠海马 CA1 区凋亡因子 Bax 和抗凋亡因子 Bcl-2 阳性细胞数量和蛋白含量。结果 与 RIPC 组比较, K 组和 RK 组海马 CA1 区神经细胞 Bax 阳性细胞数量明显增多, 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 阳性细胞数量明显减少, 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$)。C 组和 RIPC 组海马 CA1 区神经细胞 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数量和蛋白含量差异无统计学意义。与 K 组比较, RK 组海马 CA1 区神经细胞 Bax 阳性细胞数量明显减少, 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 阳性细胞数量明显增多, 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。结论 远端肢体缺血预处理可减轻氯胺酮大剂量、多次注射导致的发育期大鼠海马 CA1 区神经细胞 Bcl-2、Bax 表达失衡。

【关键词】 氯胺酮; 远端肢体缺血预处理; 发育期大鼠; B 淋巴细胞瘤-2; Bcl-2 相关 X 蛋白

Effects of remote limb ischemic preconditioning on the imbalance of Bcl-2 and Bax in hippocampal CA1 neurons of neonatal rats during ketamine anesthesia LIU Ying, LI Anqi, MA Wan, GAO Yubo, DENG Liqin, ZHANG Chun, MENG Jinhai. Major of Anesthesiology, School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Corresponding author: MENG Jinhai, Email: mengjinhai2616@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of remote limb ischemic preconditioning (RIPC) on the expression imbalance of B cell lymphoma-2 (Bcl-2) and B cell lymphoma-2 associated X protein (Bax) in hippocampal CA1 neurons of the neonatal rats under ketamine anesthesia. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats on postnatal day 5, weighing 8–12 g, were randomly divided into four groups: control group (group C), remote limb ischemic preconditioning group (group RIPC), ketamine group (group K), remote limb ischemic preconditioning + ketamine group (group RK). In group C, normal saline 8 ml/kg was intraperitoneally injected on postnatal day 7, 6 times at an interval of 2 hours. Rats in group RIPC were subjected to limb ischemia for 5 minutes and reperfusion for 5 minutes for 4 cycles on postnatal day 5, and then injected with the same volume of saline after 48 hours. Rats in group K were intraperitoneally injected with ketamine 20 mg/kg instead of normal saline, once every 2 hours after administration for 6 times. Rats in group RK were subjected to remote ischemic preconditioning on postnatal day 5 and underwent the same treatment as group K after 48 hours. Rats in the four groups were sacrificed to cardiac perfusion on postnatal day 9. The changes of Bcl-2 and Bax expression in the hippocampal CA1 were observed by immunohistochemistry and western blot. **Results** Compared with group RIPC, expression of Bax in groups K and RK was significantly increased while Bcl-2 expression was significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant change in the expression of Bcl-2 and Bax between group RIPC and group C. Compared with group K, Bax in group RK was significantly decreased while Bcl-2 expression was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Remote limb ischemic preconditioning reduces the imbalance of Bcl-2, Bax in the

DOI: 10.12089/jca.2020.02.015

基金项目: 国家自然科学基金(81560225); 宁夏自然科学基金(NZ15143)

作者单位: 750004 银川市, 宁夏医科大学临床医学院麻醉学系(刘颖、李安琪); 宁夏医科大学总医院麻醉科(马万、高宇博、邓立琴、孟尽海); 宁夏医科大学颅脑疾病重点实验室(张春)

通信作者: 孟尽海, Email: mengjinhai2616@163.com

hippocampal CA1 region induced by multiple exposure of ketamine in developmental rats.

【Key words】 Ketamine; Remote limb ischemic preconditioning; Developmental rats; B cell lymphoma-2; Bcl-2 associated X protein

近年来大量研究指出,早期或过量接触麻醉药可诱导神经细胞的广泛凋亡^[1-2]。氯胺酮是一种非竞争性的 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗药,在动物大脑发育敏感期高剂量和/或多次注射氯胺酮会导致神经毒性^[3]。目前,全麻药诱导发育期神经毒性的机制尚不清楚且缺乏有效的防治措施。有研究表明,远端肢体缺血预处理(remote limb ischemic preconditioning, RIPC)在不同的动物大脑损伤模型中都具有保护作用^[4-5]。然而,RIPC对氯胺酮在大脑发育过程中诱导的神经毒性的影响尚不明确。本研究观察 RIPC对发育期大鼠反复氯胺酮暴露引起的抗凋亡因子 Bcl-2 和凋亡因子 Bax 表达失衡的影响。

材料与方法

实验动物与分组 选取 SD 新生大鼠 48 只,5 日龄,体重 8~12 g,购自宁夏医科大学实验动物中心。将大鼠随机分为四组,每组 12 只。对照组(C 组):出生第 7 天腹腔注射生理盐水 8 ml/kg,间隔 2 h 注射 1 次,共注射 6 次。RIPC 组:出生第 5 天用橡皮筋套住右后肢根部,用拉力器拉伸 2.5 N 后肉眼观察到肢体远端颜色发绀即为阻断股动脉的标志,持续 5 min 后减压,皮肤潮红为下肢再灌注标志,再持续 5 min,整个过程循环进行,共 4 次。48 h 后腹腔注射生理盐水 8 ml/kg,间隔 2 h 注射一次,共注射 6 次。氯胺酮组(K 组):出生第 7 天腹腔注射氯胺酮 20 mg/kg,间隔 2 h 注射一次,共注射 6 次,用药后仔细观察乳鼠的皮肤颜色,有无缺氧表现。RIPC+氯胺酮组(RK 组):出生 5 d 乳鼠行远端肢体缺血预处理,48 h 后腹腔注射氯胺酮 20 mg/kg,间隔 2 h 注射一次,共注射 6 次。实验中动物置于纯氧恒温保温箱中。直至动物的翻正反射复原,大鼠完全苏醒后,返回母鼠身边喂养。

免疫组化法检测海马 CA1 区 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞 腹腔注射完成后 12 h 每组选取 6 只大鼠,经心脏灌注取脑,具体操作步骤参考文献[6]。采用计算机图像分析系统 Image J 分析软件分别统计各视野 IOD/Area 比值(平均光密度值)反映海马 CA1 区 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数量。

Western blot 法检测海马 CA1 区 Bcl-2 和 Bax 蛋白含量 每组取 6 只大鼠,断头处死,冰上迅速分离

海马组织,采用 Western blot 法测定海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 蛋白含量。采用 BCA 法提取总蛋白,测定蛋白浓度。取已定量的蛋白 40 μg,在 15% SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳 80 V,30 min 后改为 120 V,然后转至 0.45 μm 的硝酸纤维素滤膜上,转膜结束后用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 洗膜 10 min,重复 3 次后,加入兔抗 Bax 抗体(1:500)、兔抗 Bcl-2 抗体(1:100)免抗、GAPDH(1:500)4 ℃封闭过夜。TBST 洗膜 10 min,重复 3 次,分别加入相对应的辣根过氧化物酶标记的抗体(1:500),室温摇床孵育 2 h,洗膜后用 ECL 显影。采用 Image J 定量分析软件测定条带灰度值,以 Bcl-2、Bax 条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值反映 Bcl-2、Bax 蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据。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,两两比较用 LSD 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

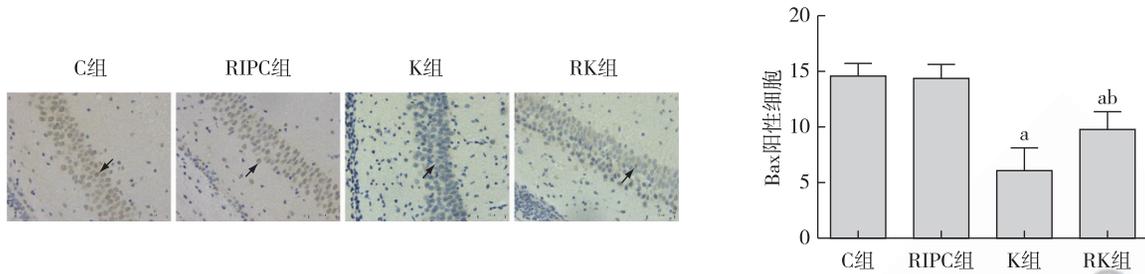
结 果

海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 阳性细胞 与 RIPC 组比较,K 组和 RK 组 Bax 阳性细胞数量明显增多($P<0.05$),Bcl-2 阳性细胞数量明显减少($P<0.05$)。C 组和 RIPC 组 Bcl-2、Bax 蛋白阳性细胞数量差异无统计学意义。与 K 组比较,RK 组 Bax 阳性细胞数量明显减少($P<0.05$),Bcl-2 阳性细胞数量明显增多($P<0.05$)(图 1—2)。

海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 蛋白含量 与 RIPC 组比较,K 组和 RK 组 Bax 蛋白含量明显升高($P<0.05$),Bcl-2 蛋白含量明显降低($P<0.05$)。C 组和 RIPC 组海马 CA1 区 Bax 蛋白含量差异无统计学意义。与 K 组比较,RK 组 Bax 的蛋白含量明显降低($P<0.05$),Bcl-2 蛋白含量明显升高($P<0.05$)(图 3—4)。

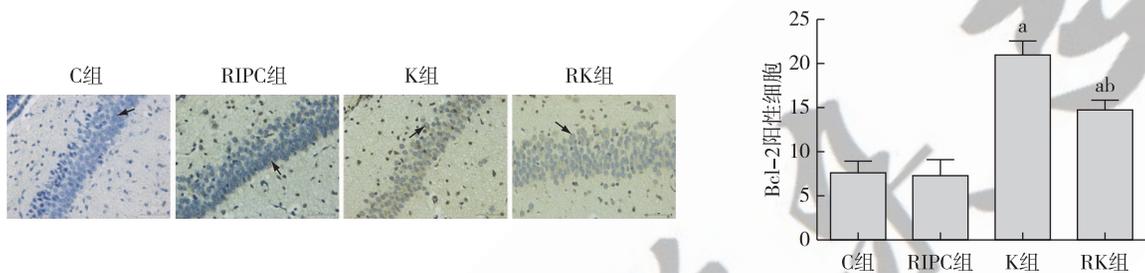
讨 论

啮齿类动物出生后 0~10 d 是大脑的快速发育期,在此期间,大脑经历了显著的增值、分化、突触的形成^[7]。因此,发育中的大脑极易受到神经毒性物质的危害从而影响大脑的生长发育。早在 1999 年就有学者证实:给出生 7 d 的大鼠多次注射 NMDA 受体的拮抗剂会造成大鼠广泛的神经细胞凋



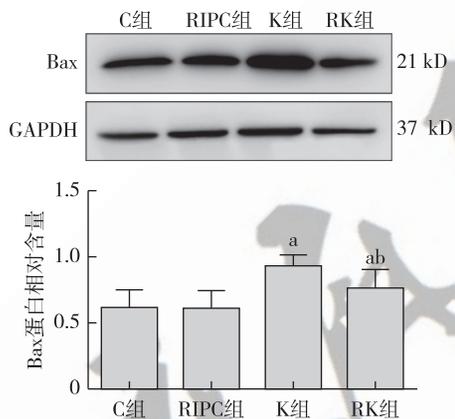
注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 K 组比较,^b $P < 0.05$;箭头示 Bcl-2 蛋白表达阳性细胞

图 1 四组大鼠海马 CA1 区 Bcl-2 蛋白免疫组织化学染色图 ($\times 400$) 和 Bcl-2 阳性细胞数量的比较



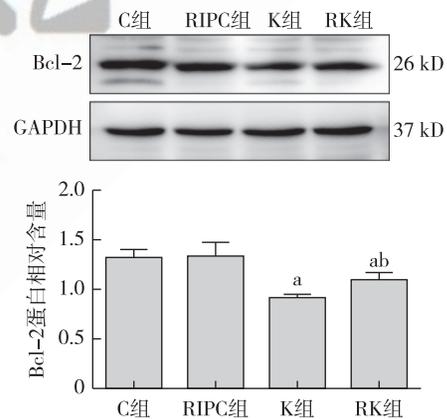
注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 K 组比较,^b $P < 0.05$;箭头示 Bax 蛋白表达阳性细胞

图 2 四组大鼠海马 CA1 区 Bax 蛋白免疫组织化学染色图 ($\times 400$) 和阳性细胞数量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 K 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 四组大鼠海马 CA1 区 Bax 蛋白含量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 K 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 四组大鼠海马 CA1 区 Bcl-2 蛋白含量的比较

亡^[8]。随后,越来越多的动物以及临床研究提示,全麻药物的极端使用会造成大脑的形态学和功能改变^[9-10]。本研究使用出生 7 d 的大鼠,因为此时神经元具有高度的可塑性,易受内外环境的影响。

有研究表明,氯胺酮可呈剂量及时间依赖性诱导发育期动物神经细胞凋亡,且剂量和时间作用具有协同性,高剂量重复注射可导致神经细胞退行性变^[11]。Bax 基因是人体重要的凋亡基因,Bcl-2 是抗凋亡基因,编码的 Bax 蛋白可与 Bcl-2 蛋白形成异二聚体,对 Bcl-2 产生阻抑作用。Bax 与 Bcl-2 的

相互作用调控细胞凋亡。本实验参照 Ma 等^[6]选用氯胺酮 20 mg/kg 多次腹腔注射观察凋亡和抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达情况。结果显示,新生大鼠多次注射大剂量的氯胺酮可致大脑海马 CA1 区神经细胞 Bax 表达增加而 Bcl-2 表达降低。

RIPC 是指通过间断的非致死量的远端肢体缺血刺激来诱导大脑的缺血耐受从而在后期脑缺血事件中保护神经元、改善预后的一种干预措施。有关 RIPC 的研究使用了不同的方法,如单侧上肢、单侧下肢及双侧肢体,但是各方法的有效性是否存在差异,

尚未得到证实^[12-13]。RIPC 每个周期的缺血持续时间数和周期数以及压迫肢体的数量,在以往研究中也有所不同。但有动物研究表明,3 个周期的肢体预处理对神经细胞的保护作用优于 2 个周期^[14],多数动物研究采用 4 个周期的缺血-再灌注处理,每个周期缺血 5 min,再灌注 5 min,因此本实验选用对出生 5 d 的大鼠行单侧肢体 4 个周期 RIPC 的方法。且 RIPC 存在两个保护时相:快速期保护和延迟期保护,快速期保护始于缺血预处理后持续 3 h,而延迟期可持续至 48 h 后^[15-16]。故本研究在 RIPC 48 h 后行多次注射氯胺酮处理。有研究认为短暂的缺血预处理具有减轻继发性脑缺血-再灌注损伤的作用,且肢体的 RIPC 对脑缺血具有耐受性^[5,16]。Meng 等^[12]证实双侧上臂短暂反复缺血预处理可改善颅内动脉狭窄的脑灌注,减少卒中复发。然而,RIPC 对氯胺酮引起的神经细胞凋亡因子和抗凋亡因子表达改变的影响鲜有报道。本研究结果显示,氯胺酮可增加凋亡蛋白 Bax 同时降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,而 RIPC 可减轻由氯胺酮诱导的 Bcl-2 和 Bax 的变化,提示 RIPC 可通过调节 Bax/Bcl-2 的表达从而发挥保护作用,这一结果与 RIPC 可保护其他脑损伤模型结论一致。

综上所述,将发育期大鼠暴露于大剂量的氯胺酮中会引起大脑海马 CA1 区神经细胞 Bax 表达增高而 Bcl-2 表达下降,RIPC 可减轻氯胺酮导致的发育期大鼠海马 CA1 区神经细胞 Bcl-2、Bax 的表达失衡。

参 考 文 献

- [1] Xiao R, Yu D, Li X, et al. Propofol exposure in early life induced developmental impairments in the mouse cerebellum. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 373.
- [2] O'Farrell RA, Foley AG, Buggy DJ, et al. Neurotoxicity of inhalation anesthetics in the neonatal rat brain: effects on behavior and neurodegeneration in the piriform cortex. *Anesthesiol Res Pract*, 2018, 2018: 6376090.
- [3] Zhao T, Li C, Wei W, et al. Prenatal ketamine exposure causes abnormal development of prefrontal cortex in rat. *Sci Rep*, 2016, 6: 26865.
- [4] Wang J, Han D, Sun M, et al. A combination of remote ischemic preconditioning and cerebral ischemic postconditioning inhibits autophagy to attenuate plasma HMGB1 and induce neuroprotection against stroke in rat. *J Mol Neurosci*, 2016, 58(4): 424-431.
- [5] Hu X, Lu Y, Zhang Y, et al. Remote ischemic preconditioning improves spatial learning and memory ability after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Perfusion*, 2013, 28(6): 546-551.
- [6] Ma W, Cao YY, Qu S, et al. Remote ischemic preconditioning provides neuroprotection: impact on ketamine-induced neuroapoptosis in the developing rat brain. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(23): 4972-4979.
- [7] Sun L. Early childhood general anaesthesia exposure and neurocognitive development. *Br J Anaesth*, 2010, 105 Suppl 1: i61-i68.
- [8] Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 1999, 283(5398): 70-74.
- [9] Stratmann G, Lee J, Sall JW, et al. Effect of general anesthesia in infancy on long-term recognition memory in humans and rats. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39(10): 2275-2287.
- [10] 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.
- [11] Yan J, Huang Y, Lu Y, et al. Repeated administration of ketamine can induce hippocampal neurodegeneration and long-term cognitive impairment via the ROS/HIF-1 α pathway in developing rats. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1715-1732.
- [12] Meng R, Asmaro K, Meng L, et al. Upper limb ischemic preconditioning prevents recurrent stroke in intracranial arterial stenosis. *Neurology*, 2012, 79(18): 1853-1861.
- [13] Ayodele M, Koch S. Ischemic preconditioning in the intensive care unit. *Curr Treat Options Neurol*, 2017, 19(6): 24.
- [14] Ren C, Gao X, Steinberg GK, et al. Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience*, 2008, 151(4): 1099-1103.
- [15] Pan J, Li X, Peng Y. Remote ischemic conditioning for acute ischemic stroke: dawn in the darkness. *Rev Neurosci*, 2016, 27(5): 501-510.
- [16] Hess DC, Hoda MN, Bhatia K. Remote limb preconditioning and postconditioning: will it translate into a promising treatment for acute stroke. *Stroke*, 2013, 44(4): 1191-1197.

(收稿日期:2018-12-23)