

- 类型免疫功能研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6): 464-466.
- [5] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2003; 821-827.
- [6] 蒋娟, 于洁, 王晓莉, 等. 伴有多脏器功能损害的传染性单核细胞增多症 51 例临床分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2007, 22(2): 919-922.
- [7] OKANO M, KAWA K, KIMURA H, et al. Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection [J]. *American Journal of Hematology*, 2005, 80: 64-69.
- [8] 申昆玲, 段红梅. 重症 EB 病毒感染相关疾病的现状和诊治进展[J]. 小儿急救医学, 2005, 12(5): 342.
- [9] HENTER J I, HORNE A, ARICÓ M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Pediatric Blood Cancer*, 2007, 48(2): 124-131.
- [10] KIS L L, NAGY N, KLEIN G, et al. Expression of SH2D1A in five classical Hodgkin's disease-derived cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(5): 658-661.
- [11] PAROLINI O, KAGERBAUER B, SIMONITSCH-KLUPP I, et al. Analysis of SH2D1A mutations in patients with severe Epstein-Barr virus infections, Burkitt's lymphoma, and Hodgkin's lymphoma [J]. *Ann Hematol*, 2002, 81(8): 441-447.
- [12] SHARIFI R, SINCLAIR J C, GILMOUR K C, et al. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease [J]. *Blood*, 2004, 103(10): 3821-3827.
- [13] NAKAJIMA H, CELLA M, BOUCHON A, et al. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(11): 3309-3318.
- [14] CINDY S M A, ELISSA K DEENICK. The role of SAP and SLAM family molecules in the humoral immune response [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011(1217): 32-44.
- [15] RICHARD PROUST, JACQUES BERTOGLIO, FRANCK GESBERT. The adaptor protein SAP directly associates with CD3 chain and regulates T cell receptor signaling [J]. *PLoS One*, 2012, 8(7): 1-10.
- [16] MCCAUSLAND M M, YUSUF I, TRAN H, et al. SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and fyn kinase [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(2): 817-828.
- [17] CHUANG H C, LAY J D, HSIEH W C, et al. Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome [J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3090-3096.

(编辑:王乐乐)

(收稿日期:2015-06-23 修回日期:2015-09-18)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2016.04.002

· 论 著 ·

氯胺酮对 SD 幼鼠海马 GAP-43 蛋白表达的影响

应迪琪, 严海雅 (宁波市妇女儿童医院, 浙江宁波 315012)

[摘要] 目的: 分析氯胺酮对 SD 幼鼠海马 GAP-43 蛋白表达的影响。方法: 取 7~10 日龄的 SD 幼鼠 36 只, 随机分为 A、B、C 三组各 12 只。A 组注射生理盐水 50 mg/kg, B 组注射氯胺酮 25 mg/kg, C 组注射氯胺酮 50 mg/kg。24 h 后处死小鼠取海马组织, 分别采用免疫组化与 Western Blotting 检测海马 GAP-43 蛋白的表达情况。结果: 经图像分析软件处理后得知, A 组、B 组、C 组条带灰度值分别为 187.43 ± 7.98 、 164.87 ± 8.35 、 154.31 ± 6.98 , 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。A 组、B 组、C 组 GAP-43 阳性细胞计数分别为 (87.45 ± 14.98) 个/ mm^2 、 (66.48 ± 12.36) 个/ mm^2 、 (35.32 ± 9.93) 个/ mm^2 , 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 氯胺酮可明显降低 SD 幼鼠海马 GAP-43 蛋白的表达水平, 这可能与其影响幼鼠神经系统发育有关。

[关键词] 氯胺酮; SD 幼鼠; 海马组织; GAP-43 蛋白

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2016)04-0004-03

Effect of Ketamine on GAP-43 Protein Expression in Hippocampus of SD Rats

Ying Diqi, Yan Haiya (Ningbo Women and Children's Hospital, Zhejiang Ningbo 315012, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ketamine on the expression of GAP-43 protein in hippocampus of SD rats. **Methods:** Thirty six SD rats who were 7 to 10 days old, were randomly divided into three groups. Group A of 12 rats were injected with saline 50 mg/kg, group B of 12 rats were injected with ketamine 25 mg/kg, group C of 12 rats were injected with ketamine 50 mg/kg. All rats were sacrificed and the hippocampuses were drawn out after 24 hours. Immunohistochemistry and Western Blotting were used to detect

作者简介: 应迪琪 (1982.01~), 男, 硕士在读, 主治医师, 主要从事麻醉临床与基础研究, E-mail: nbyingdiqi@163.com。

the expressions of hippocampal GAP-43 protein. **Results:** Then we analyzed the results by image analysis software, gray stripe value of group A was 187.43 ± 7.98 , striped gray value of group B was 164.87 ± 8.35 , striped gray value of group C was 154.31 ± 6.98 , there were statistical differences between three groups ($P < 0.01$). The GAP-43 positive cell count in group A was $(87.45 \pm 14.98)/\text{mm}^2$, group B was $(66.48 \pm 12.36)/\text{mm}^2$, group C was $(35.32 \pm 9.93)/\text{mm}^2$, there were statistical differences between three groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ketamine can significantly reduce the expression level of GAP-43 protein in the hippocampus of SD rats, which may be related to the development of the nervous system in young rats.

[**Keywords**] ketamine; SD rats; hippocampus; GAP-43 protein

N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体是兴奋性谷氨酸受体的一个亚型,与记忆、学习、神经系统发育等过程密切相关^[1-2]。氯胺酮是一种 NMDA 受体拮抗剂,广泛应用于临床麻醉中^[3-4]。GAP-43 是一种神经生长相关蛋白,分子量为 24 kD,是神经生长、神经再生、突触形成、突触重建、神经元发育的标志性蛋白^[5-6]。本研究选取 7~10 日龄的 SD 幼鼠 36 只作为临床研究对象,通过比较氯胺酮不同浓度下的海马 GAP-43 蛋白表达情况,探讨氯胺酮对神经系统发育的影响,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 仪器与试剂

盐酸氯胺酮(山西金源通制药有限公司,国药准字 H14021800);免疫组织化学试剂盒及二抗(北京索莱宝科技有限公司);GAP-43 蛋白单抗(美国圣克鲁斯公司);PVDF 膜(瑞士豪夫迈·罗氏公司);DAB 试剂盒(中山生物公司);RIPA 缓冲液(上海远慕生物科技有限公司)。

1.2 分组

选取 7~10 日龄的 SD 幼鼠 36 只,雌雄不限,体重为 8~15 g。随机分为 A、B、C 三组各 12 只。A 组注射生理盐水 50 mg/kg, B 组注射氯胺酮 25 mg/kg, C 组注射氯胺酮 50 mg/kg。三组 SD 幼鼠于注射完成后 24 h 处死取材。每组幼鼠随机挑选 6 只剥离海马组织,匀浆后进行 Western Blotting 检测;每组剩余 6 只幼鼠行全脑中后 1/3 的连续冠状冰冻切片,进行免疫组织化学染色。

1.3 检测方法

1.3.1 Western Blotting 检测 三组幼鼠随机选择 6 只进行 Western Blotting 检测。SD 幼鼠在注射完成 24 h 后断头处死,在冰台上剥离海马组织并称重。在海马组织中加入 10 mg/mL 苯甲基磺酰氟与 RIPA 缓冲液(每克组织 10 μL),冰浴充分匀浆后移入离心管(20 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$),离心 30 min 后取上层清液置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。采用 Bradford 比色试剂盒测定其蛋白浓度,取等质量的细胞裂解液与 2 倍体积的电泳缓冲液煮沸 5 min 后取上层清液,在 120 mV 15% 分离胶与 80 mV 5% 浓缩胶下电泳,将蛋白干转至 PVDF 膜上,丽春红染膜证明存在蛋白条带。将 0.125 mL/cm² 封闭液与 PVDF 膜置

入塑料袋中密封,缓慢水平摇动 1 h 后弃除封闭液,加入 1:500 稀释兔抗鼠 GAP43 单抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后用 TBST 缓冲液洗涤 4 次,再用双蒸水洗涤 3 次后置入 DAB 显色液中轻轻摇晃直至染色条带出现。利用图像分析软件(德国莱卡公司)扫描成像,测量条带灰度值,衡量染色程度。

1.3.2 免疫组织化学检测 每组剩余 6 只幼鼠用于免疫组织化学检测。注射完成后 24 h 处死,行全脑中后 1/3 的连续冠状冰冻切片,每个标本选取 3 张切片。将切片置于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中漂洗 3 次,3% 双氧水中孵育 0.5 h 后再用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,加入 1:250 稀释兔抗鼠 GAP-43 蛋白单抗,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。在 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中漂洗 3 次,正常山羊血清工作液封闭 0.5 h 后滴加生物素标记的羊抗鼠 IgG,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 1 h 后再用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,滴加过氧化物酶标记链霉卵白素,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 30 min 后用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,加入 DAB 显色液 3 min 后终止反应。利用图像分析系统(德国莱卡公司)计数显微镜下阳性细胞数。光镜下 GAP-43 蛋白阳性表达细胞呈深棕色,细胞核不染色。

1.4 统计学方法

应用 Excel 2013、SPSS19.0 软件,计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western Blotting 检测结果

经图像分析软件处理后得知, A 组条带灰度值为 187.43 ± 7.98 , B 组条带灰度值为 164.87 ± 8.35 , C 组条带灰度值为 154.31 ± 6.98 , 组间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 Western Blotting 检测结果

项目	A 组	B 组	C 组
条带灰度值	187.43 ± 7.98	164.87 ± 8.35	154.31 ± 6.98
<i>t</i>	$t_{AB} = 6.767$	$t_{BC} = 4.241$	$t_{AC} = 10.822$
<i>P</i>	$P_{AB} < 0.01$	$P_{BC} < 0.01$	$P_{AC} < 0.01$

2.2 免疫组织化学检测结果

经图像分析软件处理后得知, A 组 GAP-43 阳性细胞计数为 (87.45 ± 14.98) 个/ mm^2 , B 组 GAP-43 阳性细

胞计数为 (66.48 ± 12.36) 个/ mm^2 , C 组 GAP-43 阳性细胞计数为 (35.32 ± 9.93) 个/ mm^2 , 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 免疫组织化学检测结果

项目	A 组	B 组	C 组
GAP-43 阳性细胞计数	87.45 ± 8.98	66.48 ± 6.36	35.32 ± 5.93
t	$t_{AB} = 6.601$	$t_{BC} = 12.413$	$t_{AC} = 17.781$
P	$P_{AB} < 0.01$	$P_{BC} < 0.01$	$P_{AC} < 0.01$

3 讨论

GAP-43 蛋白与突触可塑性、轴突生长及再生有关, 主要位于突触前膜。在突触形成与轴突外生时, GAP-43 高度表达, 且这种高表达会维持在整个大脑发育阶段^[7]。GAP-43 高表达可见于神经损伤再生与突触发生过程中。NMDA 受体有促进神经细胞分化、增殖、迁移的功能, 同时对处在发育阶段的大脑具有营养作用, 对突触形成至关重要^[8-9]。目前国内外对 NMDA 受体与 GAP-43 蛋白之间的关系没有定论。但已有报道显示, 阻断 NMDA 受体可明显降低海马中颗粒细胞 GAP-43 蛋白 mRNA 的表达水平^[10]。

氯胺酮是 NMDA 受体的非竞争拮抗剂之一, 主要用于 NMDA 受体苯环哌啶位点, 大量的谷氨酸与 NMDA 均无法逆转氯胺酮的结合, 目前广泛应用于人体和其他动物中。已有证据表明, 人类的大脑快速发育阶段是胚胎晚期至出生后 2 年, 而 SD 大鼠出生至出生后 14 d 是 NMDA 受体的高度敏感期, 在这个阶段大脑发育迅速, 树突出芽、轴突延伸迅速, 突触大量形成, 若在这个时期抑制 NMDA 受体会严重阻碍大脑发育, 导致大量神经细胞死亡; 还将在大脑快速发育阶段改变细胞死亡模式, 影响神经回路形成^[11-13]。使用氯胺酮对大脑发育完全的机体是否有影响尚无定论, 但有证据表明, 使用氯胺酮作为麻醉药可能导致潜在精神行为缺陷。

本研究 Western Blotting 与免疫组化检测结果显示, A 组的 GAP-43 表达均明显高于 B 组与 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且 B 组的 GAP-43 表达均明显高于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。这说明注射氯胺酮会下调海马颗粒细胞中 GAP-43 蛋白的表达, 且这种下调作用与氯胺酮的浓度呈正相关, 注射浓度越高, GAP-43 蛋白表达下调越显著。氯胺酮的作用机制为激活 NMDA 受体后组织谷氨酸的离子通道, 从而减少 Ca^{2+} 的内流; 同时 GAP-43 蛋白的激活与释放需要一定浓度的 Ca^{2+} , 因而氯胺酮主要是通过减少 Ca^{2+} 的内流下调 GAP-43 蛋白的表达, 故无法说明氯胺酮注射对 GAP-43 蛋白远期表达的影响。

综上所述, 氯胺酮可明显降低 SD 幼鼠海马 GAP-43 蛋白的表达, 这可能与影响幼鼠神经系统发育有关。

参考文献:

- [1] WALKER A K, BUDAC D P, BISULCO S, et al. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice [J]. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(9): 1609-1616.
- [2] BURGDORF J, ZHANG X, NICHOLSON K L, et al. GLYX-13, a NMDA receptor glycine-site functional partial agonist, induces antidepressant-like effects without ketamine-like side effects [J]. Neuropsychopharmacology, 2012, 38(5): 729-742.
- [3] BEUREL E, SONG L, JOPE R S. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice [J]. Molecular Psychiatry, 2011, 16(11): 1068.
- [4] PAULE M G, LI M, ALLEN R R, et al. Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys [J]. Neurotoxicol Teratol, 2011, 33(2): 220-230.
- [5] 刘健, 杨小玉, 杨茂光, 等. 中枢神经损伤后 GAP-43 蛋白对神经再生及轴突导向作用及其机制的研究进展 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2013, 39(1): 180-183.
- [6] 李威, 周军, 廖达光, 等. 神经节苷脂在大鼠脑外伤中对 GAP-43 蛋白表达的影响 [J]. 现代医药卫生, 2011, 27(11): 1601-1603.
- [7] GRASSELLI G, MANDOLESI G, STRATA P, et al. Impaired sprouting and axonal atrophy in cerebellar climbing fibres following in vivo silencing of the growth-associated protein GAP-43 [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20791.
- [8] KULKARNY V V, WIEST N E, MARQUEZ C P, et al. Opposite effects of acute ethanol exposure on GAP-43 and BDNF expression in the hippocampus versus the cerebellum of juvenile rats [J]. Alcohol, 2011, 45(5): 461-471.
- [9] JAKEN R J, VAN GORP S, JOOSTEN E A, et al. Neuropathy-induced spinal GAP-43 expression is not a main player in the onset of mechanical pain hypersensitivity [J]. J Neurotrauma, 2011, 28(12): 2463-2473.
- [10] BIRD C W, GARDINER A S, BOLOGNANI F, et al. KSRP modulation of GAP-43 mRNA stability restricts axonal outgrowth in embryonic hippocampal neurons [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79255.
- [11] 高艳, 赵佳佳, 陈雪, 等. 氯胺酮对幼龄小鼠自主活动的影响和致遗忘作用及其与 GABA_A、NMDA 受体的关系 [J]. 中国药房, 2013, 24(1): 27-29.
- [12] 刘玥, 郑亚国, 顾小萍, 等. NMDA 受体拮抗剂预防瑞芬太尼诱发术后痛觉过敏的效果: Meta 分析 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 31(10): 1170-1174.
- [13] 袁国艳, 任铭新, 郭义威, 等. 离子型谷氨酸受体拮抗剂 MK-801 浓度与全脑缺血再灌注大鼠海马内源性神经干细胞的增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(6): 1003-1006.

(编辑: 杨丹)

(收稿日期: 2015-05-18 修回日期: 2015-06-26)