

异丙酚对大鼠海马 CA1 区神经元兴奋性突触传递的影响

谢玉波 徐林 熊文勇 刘敬臣

【摘要】 目的 研究异丙酚对大鼠海马 CA1 区神经元兴奋性突触后电流 (EPSC) 和自发性兴奋性突触后电流 (sEPSC) 的影响。方法 Wistar 大鼠断头后分离海马脑组织, 制成 400 μm 厚度的海马脑片, 脑片随机分为 5 组 ($n = 10$)。脂肪乳剂 I 组、异丙酚 I 组、SR95531 + 异丙酚组; 记录 EPSC 10 min (基础值) 后分别加入 10% 脂肪乳剂 90 μl 、1% 异丙酚 90 μl (相当于 100 $\mu\text{mol/L}$)、10 $\mu\text{mol/L}$ SR95531 + 100 $\mu\text{mol/L}$ 异丙酚, 继续记录 EPSC 40 min, 分析 EPSC 幅值的变化。脂肪乳剂 II 组、异丙酚 II 组: 细胞破膜后稳定 10 ~ 15 min, 分别加入 10% 脂肪乳剂 90 μl 和 1% 异丙酚 90 μl , 记录 sEPSC 40 min, 分析 sEPSC 频率、幅值和半衰期的变化。膜钳制电压均为 -70 mV。结果 与基础值比较, 给药后脂肪乳剂 I 组和 SR95531 + 异丙酚组 EPSC 幅值差异无统计学意义, 异丙酚 I 组 EPSC 幅值降低; 给药后异丙酚 I 组 EPSC 幅值比脂肪乳剂 I 组降低 ($P < 0.05$)。与脂肪乳剂 II 组比较, 异丙酚 II 组 sEPSC 的频率、幅值降低、半衰期缩短 ($P < 0.05$)。结论 异丙酚主要通过增强大鼠海马 CA1 区神经元突触前膜和突触后膜的 GABA_A 受体活性, 产生突触前抑制和突触后抑制, 从而抑制兴奋性突触传递。

【关键词】 二异丙酚; 突触传递; 海马; 神经元

Effects of propofol on excitatory synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons in rats XIE Yu-bo*, XU Lin, XIONG Wen-yong, et al. * Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of propofol on the whole-cell excitatory postsynaptic currents (EPSC) and spontaneous excitatory postsynaptic current (sEPSC) in hippocampal CA1 neurons. **Methods** Wistar rats (13-19 days old) weighing 40-60 g were decapitated and the hippocampi were immediately removed and placed in 0-4°C artificial CSF aerated with 95% O₂ and 5% CO₂. The hippocampi were sliced (400 μm thick). EPSCs were recorded in hippocampal CA1 neurons by stimulating the Schaffer collateral / commissural pathway. The 50 slices were divided into 5 groups ($n = 10$ each): group I intralipid-1; group II propofol-1; group III SR95531 + propofol; group IV intralipid-2 and group V propofol-2. In group I, II and III after EPSCs were recorded for 10 min, 10% intralipid 90 μl , 1% propofol 90 μl (final concentration was 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and SR95531 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + propofol 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were added to the perfusate and again EPSCs were recorded for 40 min. The changes in amplitude of EPSC were analyzed. In group IV and V after the cell membrane was perforated and being stabilized for 10-15 min 10% intralipid 90 μl and 1% propofol (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was added to the perfusate and sEPSCs were recorded without stimulation. The holding potential was -70 mV. **Results** Intralipid didn't affect EPSC but propofol 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ reduced EPSC to 47.7% of the baseline value. SR95531 could reverse the effect of propofol on EPSCs. The frequency, amplitude and decay time of sEPSC in group propofol-2 were reduced to 31.9%, 70.9% and 50.7% of those in group IV (intralipid-2) ($P < 0.05$). **Conclusion** Propofol could inhibit excitatory transmission in hippocampal CA1 neurons by enhancing the activity of GABA_A receptor on pre- and post-synaptic membrane.

【Key words】 Propofol; Synaptic transmission; Hippocampus; Neurons

作者单位: 530021 南宁市, 广西医科大学附属第一医院麻醉科 (谢玉波、刘敬臣); 中国科学院昆明动物研究所学习与记忆实验室 (徐林、熊文勇)

通信作者: 谢玉波, 530021 南宁市, 广西医科大学附属第一医院麻醉科 (E-mail: xieyubo715001@yahoo.com.cn)

异丙酚是一种脂溶性的短效静脉麻醉药,广泛用于麻醉诱导与维持、ICU 患者镇静、癫痫持续状态的治疗等。但异丙酚的作用机制迄今仍未阐明。有研究认为异丙酚易化或直接激活 γ -氨基丁酸(GABA)受体,增强 GABA 抑制性突触传递,抑制兴奋性突触传递,产生中枢抑制效应^[1-3],但其作用机制尚不清楚。本研究拟观察异丙酚对新生大鼠海马 CA1 区神经元兴奋性突触后电流(EPSC)和自发性兴奋性突触后电流(sEPSC)的影响。

材料与方法

试剂与药品 人工脑脊液(mmol/L): NaCl 118、KCl 4.75、KH₂PO₄ 1.19、NaHCO₃ 25、MgSO₄ 1.19、D-glucose 11、CaCl₂·2H₂O 2.94, pH7.4; 电极内液(mmol/L): K-gluconate 170、HEPES 10、NaCl 10、MgCl₂ 2、EGTA 0.2、Mg-ATP 3.5、Na-GTP 1.0, pH7.2。异丙酚(批号: LI071, AstraZeneca 公司, 英国), 脂肪乳剂(批号: 0010801, 四川乐山裕恒药业公司), SR95531(批号: S106, Sigma 公司, 美国)为 GABA_A 受体竞争性拮抗剂。其余所用药品及试剂均购自美国 Sigma 公司。

脑片制备 13~19 d 雄性 Wistar 大鼠 45 只, 体重 40~60 g(成都军区昆明总医院动物中心), 快速断头取海马脑组织, 置入 0~4℃ 人工冰水脑脊液(以 95% O₂-5% CO₂ 饱和)的切片槽中。应用 HA752 型振动式切片机(Campden 公司, 英国)制成 400 μ m 厚海马脑片, 置 37℃ 孵育槽孵育 1 h 后室温(20~25℃)继续孵育 1 h。孵育槽中为以 95% O₂-5% CO₂ 饱和的人工脑脊液。

电生理学记录 脑片移至记录槽中, 通过出入水管道以 95% O₂-5% CO₂ 饱和的人工脑脊液持续灌注, 温度 30~32℃, 流速 3 ml/min 左右, 循环液容积 50 ml。采用 Puller-97 微电极拉制仪(Sutter 公司, 美国)将内径 1.5 mm 硅硼玻璃管(GRAY 玻璃公司, 美国)拉制成实验用记录电极, 电极电阻为 3.5~5 M Ω 。全细胞记录采用 Axopatch 200B(Axon 公司, 美国)膜片钳放大器, 电刺激脉冲的给出及电信号的采集通过计算机程序 Clampx8.0 及 digidata1320A 接口完成。采样频率为 10kHz, 低通 Bessel 滤波频率为 2kHz。膜钳制电压为 -70mV。

50 张脑片随机分为 5 组($n = 10$): 脂肪乳剂 I 组、异丙酚 I 组、SR95531 + 异丙酚组、脂肪乳剂 II 组和异丙酚 II 组。

脂肪乳剂 I 组、异丙酚 I 组、SR95531 + 异丙酚组用 PSIU6 刺激隔离器(A-MSystems 公司, 美国)连接双极刺激电极刺激 Schaeffer 侧支/联合纤维(刺激时间为 0.1 ms, 刺激间隔为 20 s), 在 CA1 区锥体神经元先记录 EPSC 10 min(基础值), 然后分别加入 10% 脂肪乳剂 90 μ l、1% 异丙酚 90 μ l(终浓度为 100 μ mol/L)、10 μ mol/L SR95531 + 100 μ mol/L 异丙酚, 继续记录 EPSC 40 min。刺激强度以达最大 EPSC 的 50%~60% 为宜。持续监测接触电阻, 接触电阻稳定的细胞用于数据分析, 否则剔除。

脂肪乳剂 II 组和异丙酚 II 组记录电极与脑片上单细胞 G Ω 封接、细胞破膜后稳定 10~15 min, 分别加入 10% 脂肪乳剂 90 μ l、1% 异丙酚 90 μ l, Schaeffer 侧支/联合纤维不给予任何刺激, 在 CA1 区神经元直接进行全细胞记录 sEPSC 40 min。记录加入脂肪乳剂或异丙酚后 30~35 min 的 sEPSC, 分析两组 sEPSC 的频率、幅值和半衰期(sEPSC 幅值从 90% 衰减到 37% 所用的时间)。

统计学处理 采用 Origin 5.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

大鼠海马 CA1 区神经元 EPSC 的比较 与基础值比较, 给药后脂肪乳剂 I 组和 SR95531 + 异丙酚组 EPSC 幅值差异无统计学意义, 异丙酚 I 组 EPSC 幅值降低; 给药后异丙酚 I 组 EPSC 幅值比脂肪乳剂 I 组降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三组给药前后 EPSC 幅值的比较(pA, $n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	基础值	给药后
脂肪乳剂 I 组	0.997 \pm 0.016	0.988 \pm 0.019
异丙酚 I 组	1.001 \pm 0.018	0.477 \pm 0.012* #
SR95531 + 异丙酚组	1.009 \pm 0.021	0.969 \pm 0.017

与基础值比较, * $P < 0.05$ 与脂肪乳剂 I 组比较, # $P < 0.05$

大鼠海马 CA1 区神经元 sEPSC 的比较 与脂肪乳剂 II 组比较, 异丙酚 II 组 sEPSC 的频率、幅值降低、半衰期缩短($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组 sEPSC 频率、幅值、半衰期的比较($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	频率(Hz)	幅值(pA)	半衰期(ms)
脂肪乳剂 II 组	0.166 \pm 0.032	14.1 \pm 0.4	13.3 \pm 0.5
异丙酚 II 组	0.053 \pm 0.011*	10.0 \pm 0.4*	6.7 \pm 0.3*

与脂肪乳剂 II 组比较, * $P < 0.05$

讨 论

研究表明 GABA_A 受体在麻醉中具有重要作用。很多静脉麻醉药如安定类、巴比妥类以及依托咪酯等都主要通过增强 GABA_A 受体功能而起到麻醉作用^[4,5]。海马内有丰富的 GABA 抑制性中间神经元,可以与兴奋性突触的前膜和后膜发生突触联系,当抑制性中间神经元活动增强时,兴奋性突触活动就会减弱^[4]。Hara 等^[6,7]观察了异丙酚对大鼠海马神经元 GABA_A 受体的影响,结果表明 1~200 μmol/L 异丙酚剂量依赖性地诱发内向电流,此内向电流可被荷包牡丹碱(GABA_A 受体竞争性拮抗剂)阻断。

海马组织结构与其它脑区不同,锥体神经元呈层状整齐排列,CA3 区锥体神经元发出的 Schaffer 侧支与 CA1 区神经元形成递质为谷氨酸的兴奋性单突触联系,所以海马的结构特点使其成为神经生理及药理等研究领域常用的实验材料。本实验中通过记录电极与脑片 CA1 区神经元的高阻抗(GΩ)封接、吸破细胞膜等过程使记录电极内液与细胞内液相通,在记录过程中,严密观察电极与细胞之间接触电阻的变化,接触电阻变化超过 20% 的神经元不记录在内,从而保证了全细胞突触后电流的记录。

Shyr 等^[8]研究结果表明大鼠静脉输注 60 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 异丙酚 30 min 后可产生有效的麻醉,此时异丙酚全血浓度为 (13.6 ± 1.3) μg/ml (相当于 76 μmol/L),脑内浓度为 (39.4 ± 2.7) μg/g (相当于 266 μmol/L)。因为异丙酚溶于 10% 脂肪乳剂中,为排除脂肪乳剂的影响,本研究以 10% 脂肪乳剂作对照,结果发现脂肪乳剂不影响突触传递,100 μmol/L 异丙酚降低 EPSC 幅值 52.3%;当 SR95531 和异丙酚同时应用于脑片时,EPSC 无改变。说明异丙酚通过 GABA_A 受体发挥作用。

sEPSC 反映兴奋性突触在不受外界刺激影响下的自发活动,其频率变化主要反映突触前谷氨酸的释放量,幅值变化主要与突触后膜受体特性有关^[9,10]。本研究中 100 μmol/L 异丙酚减少 sEPSC 频

率 68.1%,降低 sEPSC 幅值 29.1%,缩短 sEPSC 半衰期 49.3%。提示异丙酚的作用与突触前膜、突触后膜均有关。

综上所述,异丙酚可通过激活 GABA_A 受体产生突触前抑制和突触后抑制,从而抑制兴奋性突触传递。

参 考 文 献

- 1 Sonner JM, Zhang Y, Stabernack C, et al. GABA_A receptor blockade antagonizes the immobilizing action of propofol but not ketamine or isoflurane in a dose-related manner. *Anesth Analg*, 2003, 96:706-712.
- 2 谢玉波,曾邦雄,徐林,等.异丙酚对大鼠海马 CA1 区突触传递可塑性的影响. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24:608-611.
- 3 Irifune M, Sugimura M, Takarada T, et al. Propofol anaesthesia in mice is potentiated by muscimol and reversed by bicuculline. *Br J Anaesth*, 1999, 83:665-667.
- 4 Buggy DJ, Nicol B, Rowbotham DJ, et al. Effects of intravenous anesthetic agents on glutamate release: a role for GABA_A receptor-mediated inhibition. *Anesthesiology*, 2000, 92:1067-1073.
- 5 Krasowski MD, Koltchine VV, Rick CE, et al. Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the γ-aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Mol Pharmacol*, 1998, 53:530-538.
- 6 Hara M, Kai Y, Ikemoto Y. Enhancement by propofol of the γ-aminobutyric acid response in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat. *Anesthesiology*, 1994, 81:988-994.
- 7 Hara M, Kai Y, Ikemoto Y. Propofol activates GABA_A receptor-chloride ionophore complex in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat. *Anesthesiology*, 1993, 79:781-788.
- 8 Shyr MH, Tsai TH, Tan P, et al. Concentration and regional distribution of propofol in brain and spinal cord during propofol anesthesia in the rat. *Neurosci Lett*, 1995, 184:212-215.
- 9 Liu ZW, Yang S, Zhang YX, et al. Presynaptic α-7 nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons. *Acta Physiol Sin*, 2003, 55:731-735.
- 10 Li YX, Zhang Y, Lester HA, et al. Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 1998, 18:10231-10240.

(收稿日期:2005-05-10)

(本文编辑:魏津平)