

丙泊酚和依托咪酯对小鼠海马锥体神经元电生理特性影响的比较

傅鸣宇¹, 李树基²

1. 南方医科大学基础医学院生理教研室, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学基础医学院神经生物教研室, 广东 广州 510515

【摘要】目的:比较全身静脉麻醉药丙泊酚和依托咪酯对小鼠海马锥体神经元膜特性和微小突触后电流反应(mEPSCs)的影响。**方法:**运用全细胞膜片钳技术对C57小鼠海马细胞记录并比较分别在丙泊酚和依托咪酯作用前后动作电位反应和mEPSCs。**结果:**丙泊酚和依托咪酯均使神经元动作电位发放个数由8个降低至2个左右,使第一发放延时均显著延长,并使第一动作电位和第二动作电位峰值间隔显著增加,而动作电位峰值均无差异,另外丙泊酚组峰值间隔比依托咪酯组小。记录mEPSCs并分析发现丙泊酚组可降低mEPSCs发放频率,而对电流幅度和半峰宽无影响。依托咪酯组使mEPSCs发放频率降低,且使突触后电流幅度降低,半峰宽增加。**结论:**丙泊酚和依托咪酯均可抑制海马锥体细胞动作电位发放,且对动作电位发放延时和反应灵敏性均有抑制作用。丙泊酚通过抑制突触前囊泡释放来降低突触兴奋性传递,而对突触后无影响。依托咪酯同时抑制突触前囊泡释放和突触后通道灵敏性,从而抑制神经元mEPSCs反应。

【关键词】丙泊酚;依托咪酯;海马锥体神经元;电生理;微小突触后电流反应

【中图分类号】R338.8;R964

【文献标识码】A

【文章编号】1005-202X(2015)05-0655-05

Comparing effects of propofol and etomidate on electrophysiology properties of hippocampal pyramidal neurons of mice

FU Ming-yu¹, LI Shu-ji²

1. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To compare the effects of systemic intravenous anesthetics, propofol, and etomidate on membrane characteristics and miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) of hippocampal pyramidal neurons of mice. **Methods** The whole cell patch clamp technique was applied to record the hippocampal pyramidal neurons of C57 mouse. And the responses of action potential and mEPSCs before and after the application of propofol and etomidate were compared. **Results** Propofol and etomidate significantly decreased the number of action potential from 8 to 2, obviously increased the first spike latency and interspike interval between the first action potential and the second action potential. No significant differences were found in the peak value of action potential, and the interspike interval in propofol group was smaller than that in etomidate group. The mEPSCs were recorded. And the analyzed results showed that propofol decreased the discharge frequency of mEPSCs, but had no influence on current amplitude and half peak width, and that etomidate reduced the discharge frequency of mEPSCs, decreased the postsynaptic current amplitude and increased the half peak width. **Conclusion** Both propofol and etomidate inhibit the hippocampal pyramidal cell action potential spike and the spike latency of action potential and response sensitivity. Propofol reduces the excitatory synaptic transmission by inhibiting presynaptic vesicle release, without affecting postsynaptic, while etomidate inhibits mEPSCs of neuron by inhibiting the presynaptic vesicle release and postsynaptic channel sensitivity.

Key words: propofol; etomidate; hippocampal pyramidal neuron; electrophysiology; miniature excitatory postsynaptic currents

【收稿日期】2015-05-16

【基金项目】国家自然科学基金青年科学基金(81301168)

【作者简介】傅鸣宇(1986-),女,硕士,实验员,主要从事电生理技术教学和科研工作。Tel: 020-61648603;E-mail: mingyu18@smu.edu.cn。

【通信作者】李树基,实验师,研究方向:中枢神经系统损伤及修复的分子机制。Tel: 020-62789021;E-mail: lsj6136@163.com。

丙泊酚和依托咪酯是目前临床上最常用的两种非巴比妥类快效静脉麻醉药^[1]。丙泊酚为烷基酚的衍生物, 具有高脂溶性, 室温下为油状, 且不溶于水, 临床作用时与其他静脉药相比具有苏醒迅速而完全、持续输注后无蓄积的优点, 目前普遍用于麻醉诱导、麻醉维持、麻醉中、手术后与ICU病房的镇静。依托咪酯为咪唑类衍生物, 物理特性易溶于水, 但不稳定, 临床上因对呼吸循环影响轻微, 麻醉诱导与苏醒均较快, 且相对安全而广泛应用^[2-3]。早前研究证明全身麻醉药主要通过作用GABA受体而发挥麻醉作用^[4-5]。丙泊酚和依托咪酯直接或间接兴奋中枢神经系统中的敏感靶蛋白即是GABA_A受体, 但是因对GABA_A受体兴奋位点不同, 因而发挥着不同的麻醉作用^[6-7]。那么在细胞水平上, 丙泊酚与依托咪酯对神经细胞的膜特性有何影响尚不清楚。本实验通过记录丙泊酚和依托咪酯作用前后海马锥体神经元的动作电位和微小突触后电流反应(mEPSCs), 来阐明在细胞水平上两种麻醉药对细胞膜特性的影响差异。

1 材料和方法

1.1 脑片制备

实验用4~5周的健康C57小鼠35只(由南方医科大学动物中心提供), 戊巴比妥钠麻醉后迅速断头取脑, 并在通有95% O₂/5% CO₂的0~4℃的人工脑脊液中将海马切成厚度为300 μm的冠状切片(切片机: Vibratome 1200 Series, Leica, 德国)。脑片在37℃人工脑脊液中孵育30 min后转移至室温(25℃)的记录槽内记录。实验用人工脑脊液成分(mmol/L): 124 NaCl, 3.3 KCl, 1.4 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 g glucose, 2.5 CaCl₂, pH 7.3, 用氧混合气(95% O₂/5% CO₂)饱和通氧。所有化学试剂均购自Sigma。

1.2 电生理记录

1.2.1 动作电位发放 应用全细胞电流钳技术, 给予大鼠海马神经元胞体注入步阶为50 pA、时程为100 ms、强度从-50 pA到300 pA的电流刺激记录神经元胞体动作电位, 再通过灌流方式分别加入异丙酚^[8](100 μmol/L)和依托咪酯^[9](100 μmol/L), 记录加药后神经元动作电位发放。记录玻璃微电极由P-97 (SUTTER, 美国)制备, 电极电阻为3 MΩ~5 MΩ。电极内液成分(mmol/L): 140 K-gluconate, 4.5 MgCl₂, 10 EGTA, 4 Mg-ATP, 0.3 GTP, 10 HEPE。所有化学试剂均购自Sigma。记录系统: 数模转换器(Digidata 1322A, USA), 放大器(Muticlamp 700B, USA)与膜

片钳数据采集软件(Clampex10.0, USA)。

1.2.2 mEPSCs 反应 运用全细胞电压钳模式, 将细胞钳制在-60 mV, 稳定5 min后持续记录自发放电流反应, 实验在记录液中加入strychnine(1 μmol/L)和gaba-zine(10 μmol/L), 用以阻断甘氨酸能和伽马氨基丁酸能反应, 从而分离出mEPSCs。并通过细胞外液灌流方式分别加入异丙酚和依托咪酯, 记录加药后神经元mEPSCs反应。

1.3 统计学分析

通过SPSS13.0软件完成, 实验数据以均数±标准差表示。两组数据均数的比较采用两个独立样本 t 检验, 以 $P<0.05$ 表示有统计学意义。作图采用SPSS13.0、origin8.0、Corel DRAW等软件。

2 结果

2.1 丙泊酚和依托咪酯对海马锥体神经元电生理膜特性影响比较

实验通过全细胞膜片钳技术共记录81个海马锥体神经元。细胞形成全细胞模式后, 电流钳下给予一定电流刺激并记录神经元动作电位, 电流刺激为由-50 pA至300 pA, 步阶为50 pA, 时程为100 ms。随着电流刺激强度增加, 细胞动作电位由无到8个左右(图1a)。图1显示在最大和最小电流刺激下的动作电位反应。随着电流强度增加, 对照组最大电流刺激下动作电位数目由1个增加到8个左右($n=49$)。10 min后, 向细胞外液中分别加入异丙酚(100 μmol/L; $n=28$)和依托咪酯(100 μmol/L; $n=21$)并灌流记录, 通过对给药前后最大电流刺激强度300 pA的动作电位个数(action potential count, AP count)、第一动作电位延时(first spike latency, FSL)、第一动作电位和第二动作电位峰值时间差(interspike interval at peak value, ISI_p)、动作电位峰值电压(peak amplitude)进行统计学分析发现, 丙泊酚组和依托咪酯组与对照组在最大刺激下动作电位个数均有显著统计学差异(2 ± 1 vs 2 ± 2 vs 9 ± 2 , $P<0.01$, 图1b)。对照组平均第一反应延时($2.1\text{ ms}\pm1.5\text{ ms}$)均比丙泊酚组($10.0\text{ ms}\pm2.8\text{ ms}$)和依托咪酯组($6.4\text{ ms}\pm3.7\text{ ms}$)短, 且具有统计学差异($P<0.01$, 图1c)。对第一动作电位和第二动作电位峰值差分析发现, 3组间均有统计学差异, 且对照组($12.1\text{ ms}\pm5.7\text{ ms}$)最短, 丙泊酚组($21.0\text{ ms}\pm6.9\text{ ms}$)较依托咪酯组($94.8\text{ ms}\pm8.5\text{ ms}$)更大($P<0.05$, 图1d)。而3组间动作电位幅度无显著统计学差异(图1e), 给药前锥体神经元动作电位峰值电压幅度($76.5\text{ mV}\pm14.1\text{ mV}$,

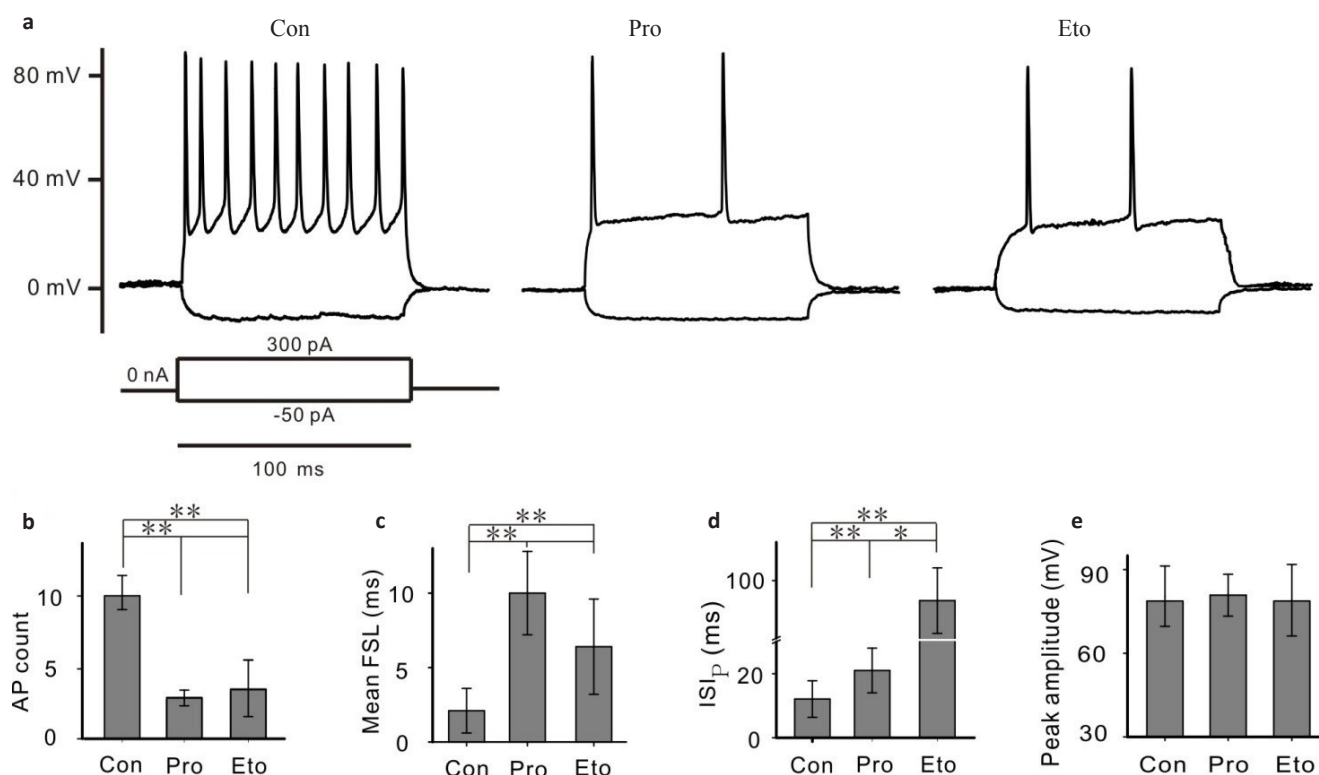


图1 丙泊酚和依托咪酯对海马锥体神经元动作电位的影响

Fig.1 Effects of propofol and etomidate on the action potential of hippocampal pyramidal neurons

a: The current injection protocol for pyramidal cells and the action potential waveform produced by injecting current. The injection current levels were respectively -50 pA, 300 pA, and the duration was 100 ms, with 0 pA holding current. b, c, d, e: Comparison of the AP count, the mean FSL, the ISI_P and peak amplitude in control group, propofol group and etomidate group. Con: Control group, $n=49$; Pro: Propofol group, $n=28$; Eto: Etomidate group, $n=21$; AP: Action potential; FSL: First spike latency; ISI_P: Interspike interval at peak value; Error bars were \pm SE. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Independent-sample t Test.

$n=28$)与给予异丙酚时电压幅度($81.7 \text{ mV} \pm 16.9 \text{ mV}$, $n=28$)无统计学差异。以上结果说明异丙酚和依托咪酯不会影响海马锥体神经元动作电位幅度,但会抑制细胞动作电位的发放,并对细胞接受刺激的反应快慢也有一定抑制和调控作用,并且通过第一动作电位和第二动作电位峰值差比较发现异丙酚和依托咪酯在调控细胞反应性时也有一定的差异。

2.2 丙泊酚和依托咪酯对海马锥体神经元 mEPSCs 的差异比较

为进一步研究丙泊酚和依托咪酯对海马锥体神经元作用差异,实验在电压钳模式下分别记录异丙酚和依托咪酯作用下海马锥体神经元 mEPSCs 反应情况,实验共记录细胞 32 个。对照组记录神经元 mEPSCs 反应后再分别加入异丙酚($n=15$)和依托咪酯($n=17$)进行灌流并记录(图 2a)。图 2b 对 3 组间的电流幅度进行统计比较,发现对照组($32.68 \text{ pA} \pm 4.52 \text{ pA}$)和丙泊酚组($28.77 \text{ pA} \pm 6.91 \text{ pA}$)电流幅度无差异,而两组的电流幅度均比依托咪酯组($16.56 \text{ pA} \pm$

8.18 pA)大,且均具有统计学意义($P<0.05$),说明依托咪酯通过降低突触后细胞通道的反应性来降低电流幅度,而丙泊酚对突触细胞通道无影响。实验通过半峰宽(half peak width, 半峰宽=AP 下降支半峰时间-AP 上升支半峰时间)比较发现,对照组($2.5 \text{ ms} \pm 0.7 \text{ ms}$)和丙泊酚组($1.9 \text{ ms} \pm 1.1 \text{ ms}$)半峰宽差异不明显,而依托咪酯组半峰宽($4.9 \text{ ms} \pm 1.1 \text{ ms}$)最长,且具有统计学意义($P<0.05$),说明依托咪酯影响细胞突触后介导通道的开放时间,而改变神经细胞突触 mEPSCs 反应(图 2c)。在对 mEPSCs 反应频率分析时发现,对照组频率($33.72 \text{ ms} \pm 9.86 \text{ ms}$)明显高于异丙酚组($4.93 \text{ ms} \pm 2.16 \text{ ms}$)和依托咪酯组($7.81 \text{ ms} \pm 4.83 \text{ ms}$),且均具有显著统计学差异($P<0.01$,图 2d),说明异丙酚和依托咪酯均同时作用在细胞突触前影响非动作电位依赖的囊泡量子释放和数量来降低神经细胞兴奋性传递,从而起到抑制神经元兴奋性反应的作用。以上结果显示,丙泊酚通过作用在海马锥体细胞突触前影响囊泡释放来降低细胞反应性,而依托

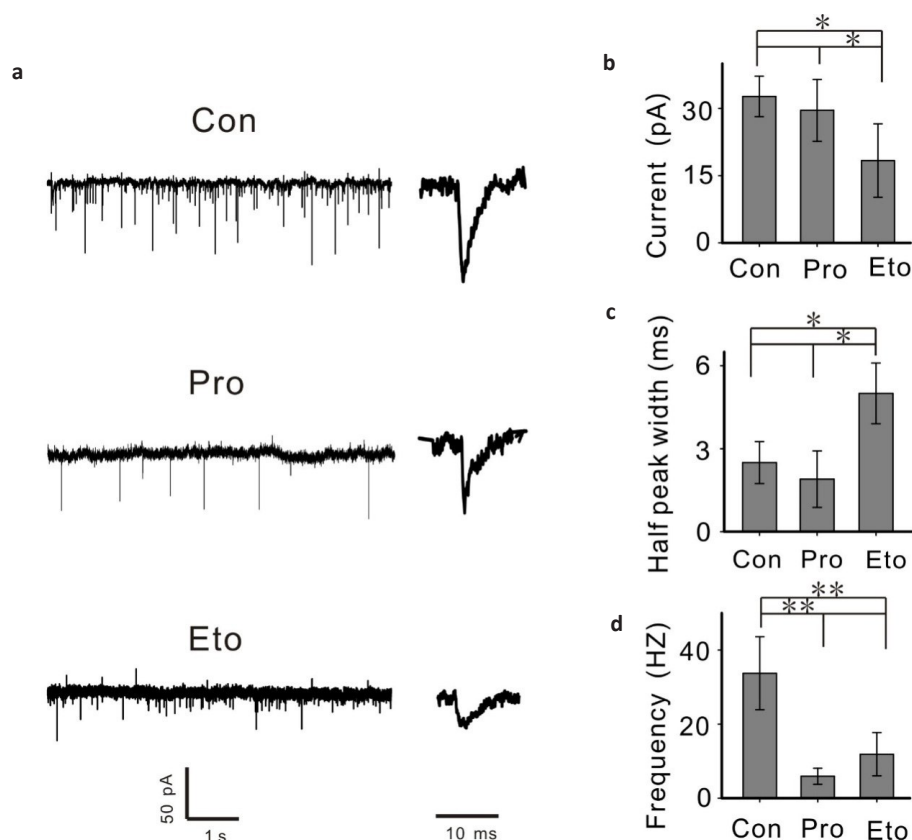


图2 异丙酚和依托咪酯对海马锥体神经元微小突触后电流的影响

Fig.2 Effects of propofol and etomidate on mEPSCs of hippocampal pyramidal neurons

a: Three original waveform recordings of mEPSCs of hippocampal pyramidal neurons in control group, propofol group and etomidate group (left) and averaged traces from mEPSCs of three individual cells, normalized to their peaks (right); b, c, d: Comparison of the current, half peak width and discharge frequency of mEPSCs in control group, propofol group and etomidate group. mEPSCs: Miniature excitatory postsynaptic currents; Pro: Propofol group, $n=15$; Eto: Etomidate group, $n=17$. Error bars were \pm SE. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Independent-sample t Test.

咪酯则同时作用到突触前和突触后,双重作用降低神经细胞反应性,而起到麻醉中枢的作用。

3 讨论

丙泊酚和依托咪酯作为目前临床上最重要的静脉麻醉药,前期研究表明主要通过直接或间接兴奋中枢神经系统敏感靶系统而达到麻醉作用,而该靶系统中最重要的即为 $GBBA_A$ 受体^[10]。丙泊酚和依托咪酯由于作用在该受体的不同位点而使麻醉作用存在一定差异性,且前期报道中都出现海马区域是全身麻醉药物作用的重要部位^[11]。在细胞水平上区分异丙泊酚和依托咪酯对海马锥体神经元基本膜特性的影响来分析研究两种麻醉药作用差异显得很有意义。

动作电位是一切生物膜反应和信号传导的基础,一定的电位刺激就能引发细胞膜内外离子流动和电位改变,从而形成电位冲动传递信号^[12]。本实验

给予适应强度的电流刺激,分别记录在丙泊酚和依托咪酯存在下海马锥体细胞动作电位发放情况。发现两种麻醉药均能使动作电位的发放数量明显减少,并且分析动作电位相应参数发现均使第一动作电位发放延时降低,峰值间隔显著延长,而对动作电位幅度无显著影响,说明两种麻醉药均通过抑制细胞动作电位发放来达到麻醉作用,有可能影响了神经元细胞上的离子通道开放数量或频率,从而使神经元对刺激的敏感性降低,在使动作电位个数减少同时一定程度上也改变动作电位产生时程。并且丙泊酚组峰值间隔明显长于依托咪酯组,说明丙泊酚和依托咪酯对细胞接受持续的外来兴奋性刺激的反应性有所差异,也暗示两种麻醉药物在细胞水平的作用机制尚有不同。

能在细胞水平上更微观精密地反应神经传导效应的即为 mEPSCs, mEPSCs 的时间精确性可以精密

且有效地反应突触前释放递质作用于突触后神经元这一信息传递过程通路完整性和差异性。mEPSCs 中 3 个重要参数即发放频率、幅度和半峰宽可有效地区分和检测突触前囊泡释放度和突触后离子通道敏感性强弱^[13]。在对丙泊酚和依托咪酯的实验中发现, 丙泊酚使 mEPSCs 的发放频率显著降低, 而对电流强度和半峰宽无影响, 说明丙泊酚对海马锥体神经元的麻醉作用主要通过抑制突触前囊泡释放来降低突触传递信号的能力, 从而达到中枢麻醉作用。实验结果中, 依托咪酯不但能降低兴奋性发放频率, 还能降低突触后电流反应幅度, 增加半峰宽时程, 说明依托咪酯首先抑制突触前囊泡释放来达到降低突触间兴奋性传导, 与前期研究结果一致^[14-15]。其次半峰宽的增加说明依托咪酯还作用于突触后通道开放的时间, 降低离子进入细胞总量。电流幅度的降低更进一步说明依托咪酯作用在突触后受体通道, 使其反应敏感性明显降低。该研究结果使全身麻醉药丙泊酚和依托咪酯在细胞水平的中枢麻醉作用中的分子机制更加明朗化, 为麻醉药物的作用机制提供了一个非常重要且不可或缺的科学依据, 也为丙泊酚和依托咪酯在临床应用过程中的原理推测方面提供了一定的理论证据。

【参考文献】

- [1] Hara M, Kai Y, Ikemoto Y, et al. Enhancement by propofol of the gamma-aminobutyric acidA response in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat[J]. *Anesthesiology*, 1994, 81(4): 988-994.
- [2] Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(5): 370-386.
- [3] Bogen IL. The importance of synapsin I and II for neurotransmitter levels and vesicular storage in cholinergic, glutamatergic and GABAergic nerve terminals[J]. *Neurochem Int*, 2009, 55: 13-21.
- [4] Guler A, Satilmis T, Celebioglu B, et al. Magnesium sulfate pretreatment reduces myoclonus after etomidate[J]. *Anesth Analg*, 2005, 101: 705-709.
- [5] 刘振伟, 王福庄. 缺氧对大鼠海马脑片 CA1 区锥体神经元膜电位的影响[J]. *神经科学*, 1994, 1(3): 41-48.
Liu ZW, Wang FZ. Effects of hypoxia on area CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices[J]. *Chinese Journal of Neuroscience*, 1994, 1(3): 41-48.
- [6] 唐建民, 刘振伟, 丁爱石, 等. 海马脑片缺氧损伤电位机制的研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 1996, 12(2): 165-169.
Tang JM, Liu ZW, Ding AS, et al. Mechanisms of hypoxic injury potential in hippocampal slices[J]. *Chinese Journal of Application Physiology*, 1996, 12(2): 165-169.
- [7] Aissaoui Y, Belyamani L, Atmani M, et al. Prevention of myoclonus after etomidate using a priming dose[J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2006, 25: 1041-1045.
- [8] 罗爱林, 杉山和英, 田玉科, 等. 联合使用异丙酚和地西泮对鼠感觉神经 r 氨基酸调控的氯电流的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2000, 20(1): 29-31.
Luo AL, Kazuhide S, Tian YK, et al. Propofol combined with diazepam synergistically potentiates the GABA-activated chloride current in rat sensory neurons[J]. *Chinese Journal of Anesthesiology*, 2000, 20(1): 29-31.
- [9] 张 军, 庄心良, 李士通, 等. 依托咪酯对大脑皮质突触体钙离子通道亚型的作用[J]. *复旦大学学报(医学版)*, 2005, 32(2): 216-218.
Zhang J, Zhuang XL, Li ST, et al. Effects of etomidate on calcium channel subtypes on cerebocortical synaptosomes[J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2005, 32(2): 216-218.
- [10] Xu LX, Jia YS, Qiu JY, et al. Expression and distribution of C-fos oncogene within central nervous system of the rat following halothane anesthesia[J]. *J Med Coll PLA*, 1997, 12: 273-278.
- [11] Torkkeli PH, Sekizawa S, French AS. Inactivation of voltage-activated Na(+) currents contributes to different adaptation properties of paired mechanosensory neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2001, 85: 1595-1602.
- [12] Yoshimura M, Nishi S. Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic current[J]. *Neuroscience*, 1993, 53(2): 519-526.
- [13] Mumgaiah HC, Hemmings KI. Effects of intravenous general anesthetics [³H]GABA release from rat cortical synaptosomes[J]. *Anesthesiology*, 1998, 89(3): 919-928.
- [14] Velísková J, Velisek L, Mares P, et al. Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1990, 37: 667-674.
- [15] Haenggi M. Anesthesia and analgesia protocol during therapeutic hypothermia after cardiac arrest: it is time to build evidence[J]. *Anesth Analg*, 2010, 110(5): 1259-1260.