

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.005

谷氨酸及 γ -氨基丁酸在氯胺酮致大鼠精神分裂样表现中的变化*

张广芬 徐世霞 孙合亮 张明强 王星明 周志强[△]

(南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院麻醉科 江苏 南京 210002)

摘要 目的:观察大鼠前额皮层谷氨酸(Glu)及 γ -氨基丁酸(GABA)在氯胺酮致精神分裂样表现中的变化。**方法:**雄性 Wistar 大鼠 32 只随机分为生理盐水组(S 组, n=16)和氯胺酮组(K 组, n=16)。腹腔注射生理盐水或氯胺酮 30 mg/kg(容积 1 mL), 一天一次, 连续 5 天, 最后一次给药后 0.5 h 及 2 h 分别通过敞箱实验观察大鼠自主活动, 并记录刻板行为评分。行为学测试后, 取大鼠前额皮层, 检测 Glu 及 GABA 含量。**结果:**与 S 组比较, K 组大鼠给药后 0.5 h 自主活动增强、刻板行为评分增高($P<0.05$), 符合精神分裂症大鼠表现; 给药后 2 h 行为学评分则无显著差异($P>0.05$); 给药后 0.5 h 及 2 h 大鼠前额皮层 Glu 水平均增加、GABA 水平均下降($P<0.05$)。与氯胺酮给药后 0.5 h 组相比, 给药后 2 h Glu 水平下降($P<0.05$)、GABA 水平则无显著差异($P>0.05$)。**结论:**氯胺酮致精神分裂样表现可能与大鼠前额皮层 Glu 增加及 GABA 减少有关。

关键词:氯胺酮; 精神分裂症; 前额皮层; 谷氨酸; γ -氨基丁酸

中图分类号: Q95-3; R749.3 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)17-3220-03

Changes of Glutamate and GABA in Ketamine-induced Psychosis-like Responses in Rats*

ZHANG Guang-fen, XU Shi-xia, SUN He-liang, ZHANG Ming-qiang, WANG Xing-ming, ZHOU Zhi-qiang[△]

(Department of Anesthesiology, School of Medicine, Nanjing University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu, 210002, China)

ABSTRACT Objective: To observe the changes of prefrontal glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in ketamine-induced psychosis-like responses in rats. **Methods:** Thirty two male Wistar rats were randomized into saline group (S group, n=16) and ketamine group (K group, n=16). Saline 1 ml and ketamine 30 mg/kg (1 ml) were intraperitoneally given every day for 5 days. Autonomic activities were observed during open field test at 0.5 h and 2 h after the last administration, the scores of stereotyped behavior were also recorded. The prefrontal cortex was harvested after behavioral test for the determination of glutamate and GABA levels. **Result:** Compared with the S group, rats in the K group showed significant increase of autonomic activities at 0.5 h after the last administration, scores of stereotyped behavior showed significant increase ($P<0.05$), which were consistent with the psychosis performance in rats. Behavioral scores had no significant difference at 2 h after the last administration between the two groups ($P>0.05$). The prefrontal glutamate level increased and GABA level decreased at 0.5 h and 2 h after ketamine administration ($P<0.05$). Compared with the K group of 0.5 h after administration, the K group of 2 h had a lower level of glutamate ($P<0.05$), but had no significant difference in respect of GABA level ($P>0.05$). **Conclusion:** Increased glutamate level and decreased GABA level in rats prefrontal cortex may contribute to ketamine-induced psychosis-like responses in rats.

Key words: Ketamine; Schizophrenia; Prefrontal cortex; Glutamate; Gamma-aminobutyric acid

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R749.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3220-03

前言

近年来研究发现氯胺酮具有快速、有效的抗抑郁作用^[1-3], 但其致精神分裂症样表现的作用可能会限制在精神科的应用及推广。研究发现氯胺酮可用于制备精神分裂症的动物模型^[4,5]。

近年来有关精神分裂症发病机制的研究较多集中于兴奋性神经递质谷氨酸(Glu)系统及抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)系统^[6,7]。有研究表明精神分裂症患者大脑 GABA 能中间神经元严重缺失、GABA 含量显著下降^[8,9]。GABA 减少可导致 Glu 信号系统去抑制, 进一步促进兴奋性 / 抑制性系统传导失衡^[10,11]。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30872424); 全军“十二五”科研面上项目(CWS11J017)

作者简介: 张广芬(1987-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 氯胺酮的药理作用,

电话: 025-80860146; E-mail: wfzhgf87@126.com

[△] 通讯作者: 周志强, 电话: 025-80860442, E-mail: zqzhou@sohu.com

(收稿日期: 2014-01-15 接受日期: 2014-02-10)

故本研究拟探讨氯胺酮对大鼠行为学的影响及 Glu、GABA 在氯胺酮致大鼠精神分裂样表现中的改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重 200 g~250 g, 由南京军区南京总医院比较医学科提供, 实验动物合格证书编号: 0007914。在室温 25℃、相对湿度为 45% 的动物房适应性饲养一周, 自由饮水, 标准饮食。

1.2 实验分组及给药

采用随机数字表法将大鼠分为以下 2 组 (n=16): 生理盐水组 (S 组) 和氯胺酮 (福建古田制药厂, 批号: 20110301) 组 (K 组)。两组大鼠每天定时腹腔注射生理盐水或氯胺酮 30 mg/kg (容积 1 mL), 一天一次, 连续五天。每个组又均分为 2 亚组, 分别于最后一次给药后 0.5 h 及 2 h 通过敞箱实验观察大鼠自主活动, 并记录刻板行为评分。行为学测试后, 取大鼠前额皮层用于 Glu 及 GABA 含量检测。

1.3 行为学测试

1.3.1 敞箱实验 应用敞箱实验进行大鼠自主活动评分, 由两名不知情人员按评分标准进行盲法测评, 取平均分。实验在一个高 40 cm、底面积 75 cm × 75 cm (均分为 25 个方格)、没有顶盖的敞箱内进行, 周围环境安静。每只大鼠被放在敞箱的中央格, 手动记录大鼠在 5 min 内的各项得分: 水平得分 (即自主运动), 定义为大鼠水平穿越的方格数, 大鼠 3 个或 4 个爪子都进入一格记为 1 分; 垂直得分 (即探索行为), 两个前爪每离开底面一次记为 1 分。自主活动评分为水平运动得分与垂直运动得分的总和。

1.3.2 刻板行为评分 由两名不知情人员按评分标准进行盲法测评, 取平均分。敞箱装置同上, 每只大鼠在 5 min 内评价 5 次, 1 min 1 次, 取 5 次的平均值作为该动物的刻板行为得分。刻板行为评分标准为: 1 分, 大鼠处于静止、睡眠状态; 2 分, 大鼠处于静止、清醒状态; 3 分, 正常的梳理和咀嚼行为; 4 分, 在箱内活动、嗅、站立 (正常的警觉行为); 5 分, 在箱内跑动 (活动亢进); 6 分, 正常活动水平下在箱内重复的探索行为 (较缓慢的方式); 7 分, 活动亢进的情况下在箱内重复的探索行为 (较快速的方式); 8 分, 在同一个位置重复快速地摆头和 / 或前肢运动 (活动受限制); 9 分, 出现跳跃、维持异常的姿势和运动障碍。

1.4 Glu 及 GABA 含量测定

Glu 含量测定采用南京建成生物工程研究所提供的检测试剂盒, 谷氨酸混合酶试剂特异性识别谷氨酸为底物, 成比例的催化产生颜色, 在 340 nm 处测光密度 (OD) 值, 通过公式计算出标本中 Glu 含量; 生物素双抗体夹心酶免疫吸附法 (ELISA) 测定 GABA 水平, 向预先包被了大鼠 GABA 单克隆抗体的酶标孔中加入待测样品 40 μL, 37℃ 温育 60 min 后, 加生物素标记的抗 GABA 抗体 10 μL、链霉亲和素-HRP 50 μL, 形成免疫复合物, 再经过温育和洗涤, 去除未结合的酶, 然后加入显色剂, 37℃ 避光显色 10 min, 加终止液终止反应。在 450 nm 处测光密度 (OD) 值, 通过绘制标准曲线求出标本中 GABA 含量。

1.5 统计学分析

计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。组间比较均采用独立 t 检验。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氯胺酮对大鼠自主活动及刻板行为的影响

与 S_{0.5} 组相比, K_{0.5} 组大鼠自主活动及刻板行为评分显著增加 (P<0.05); 与 S₂ 组相比, K₂ 组大鼠自主活动及刻板行为评分无显著变化 (P>0.05); 与 K_{0.5} 组相比, K₂ 组大鼠自主活动及刻板行为评分显著下降 (P<0.05) (图 1、图 2)。

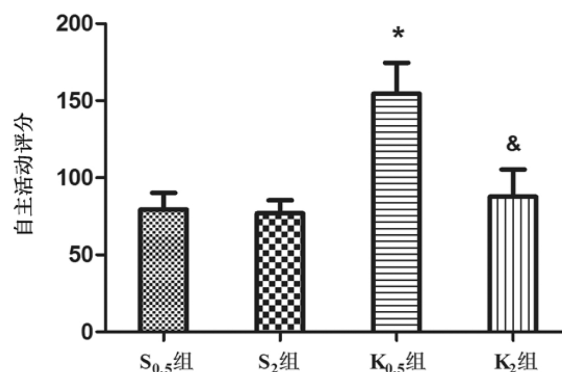


图 1 氯胺酮对大鼠自主活动的影响 *P<0.05, 与 S_{0.5} 组相比; &P<0.05, 与 K_{0.5} 组相比

Fig.1 The effects of ketamine on the locomotor activity of rats

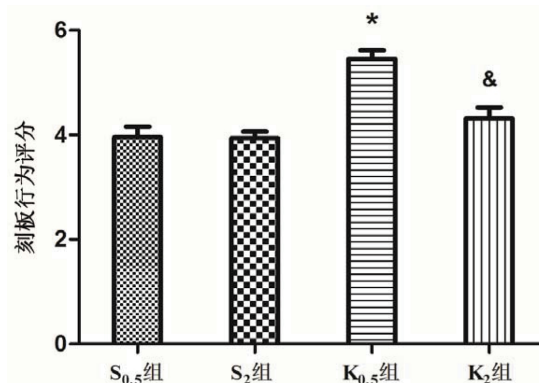


图 2 氯胺酮对大鼠刻板行为的影响 *P<0.05, 与 S_{0.5} 组相比; &P<0.05, 与 K_{0.5} 组相比

Fig.2 The effects of ketamine on the stereotypy of rats

2.2 氯胺酮对大鼠前额皮层 Glu 及 GABA 含量的影响

与 S_{0.5} 组相比, K_{0.5} 组大鼠前额皮层 Glu 含量明显增高、GABA 含量明显下降 (P<0.05); 与 S₂ 组相比, K₂ 组大鼠前额皮层 Glu 含量显著增高、GABA 含量明显下降 (P<0.05); 与 K_{0.5} 组相比, K₂ 组大鼠前额皮层 Glu 含量明显下降 (P<0.05), GABA 含量无显著差异 (P>0.05) (图 3、图 4)。

3 讨论

本研究采用亚麻醉剂量氯胺酮连续 5 天腹腔注射给药, 同时采用敞箱实验及刻板行为评分评估大鼠行为学改变。敞箱实验主要用来反映大鼠的自主活动情况, 刻板行为评分则用来评价大鼠的精神分裂样表现。

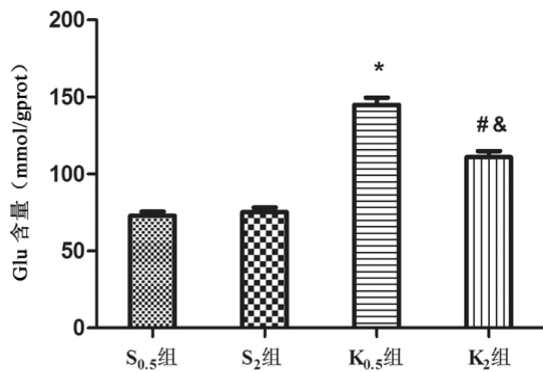


图3 氯胺酮对大鼠前额皮层 Glu 含量的影响 * $P<0.05$,与 $S_{0.5}$ 组相比; # $P<0.05$,与 S_2 组相比; & $P<0.05$,与 $K_{0.5}$ 组相比

Fig.3 The effects of ketamine on the content of Glu in the prefrontal cortex of rats

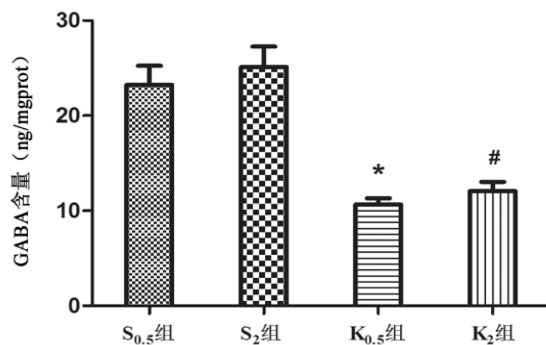


图4 氯胺酮对大鼠前额皮层 GABA 含量的影响 * $P<0.05$,与 $S_{0.5}$ 组相比; # $P<0.05$,与 S_2 组相比

Fig.4 The effects of ketamine on the content of GABA in the prefrontal cortex of rats

以往研究表明,氯胺酮 25 mg/kg 单次给药后 30 min 内能增加大鼠自主活动,诱导大鼠产生显著刻板行为,这可能与氯胺酮增加伏核细胞外液 Glu 含量有关^[12]。我们的研究结果与该研究较一致,结果表明氯胺酮连续 5 天给药最后一天给药后 0.5 h 大鼠自主活动明显增强,并出现显著的刻板行为,这些行为学改变在给药后 2 h 基本恢复。然而不同的是,我们的研究检测了大鼠前额皮层 Glu 及 GABA 含量,发现给药后 0.5 h 及 2 h 大鼠大脑前额皮层 Glu 含量均显著升高、GABA 含量均显著下降。这说明前额皮层 Glu 含量上升及 GABA 含量下降可能参与氯胺酮致精神分裂样表现。

Glu 是中枢内一种重要的兴奋性神经递质,主要介导兴奋性传递;GABA 属于抑制性神经递质,主要介导抑制性传递。神经递质 Glu 及 GABA 在情绪调节、学习和记忆中均有重要作用^[13,14]。Glu 在 GAD(谷氨酸脱羧酶)的脱羧作用下可以转化为 GABA。目前较多的观点认为 Glu 及 GABA 能神经传递改变参与了精神分裂症神经病理过程,但是很少证据直接显示 Glu 及 GABA 功能紊乱与精神分裂症之间的关系^[15,16]。有研究表明精神分裂症患者大脑 GABA 能中间神经元严重缺失、GABA 合成关键酶 GAD67 显著下降^[17-19]。同时也有研究表明精神分裂症患者血浆中 GABA 浓度减少,GABA/Glu 的比值增高与抗精神病药利哌酮的疗效有一定的相关性^[20]。这提示 GABA、Glu 传导失衡在精神分裂症发病中具有重要作用,且 Glu 水平上调及

GABA 水平下调可能是精神分裂症的重要生物标记。

本研究观察到氯胺酮 30 mg/kg 连续 5 天给药能够诱导大鼠产生明确的精神分裂症样表现,且其作用机制可能与大脑前额皮层中 GABA 下调及 Glu 上调有关。但目前并不清楚氯胺酮致精神分裂症样表现时 Glu 及 GABA 改变与其抗抑郁时的改变有何不同,因此需要进一步的研究来探讨氯胺酮抗抑郁及致精神分裂症样表现机制的区别,为氯胺酮的有效安全的应用提供依据。

参考文献(References)

- [1] Rasmussen KG, Lineberry TW, Galardy CW, et al. Serial infusions of low-dose ketamine for major depression [J]. *Journal of Psychopharmacology*, 2013,27(5):444-450
- [2] 杨春,李文媛,杨建军,等. 氯胺酮对抑郁大鼠模型抗抑郁作用研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(3):415-418
Yang Chun, Li Wen-yuan, Yang Jian-jun, et al. The antidepressant effect of ketamine on depressed rat model [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(3):415-418
- [3] Li N, Lee B, Liu RJ, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists [J]. *Science*, 2010, 329(5994):959-964
- [4] de Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, et al. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine [J]. *Metab Brain Dis*, 2011, 26(1):69-77
- [5] Noda Y, Mouri A, Waki Y, et al. Development of animal models for schizophrenia based on clinical evidence: expectation for psychiatrists [J]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 2009, 29(2):47-53
- [6] Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2001, 25(1):1-27
- [7] Lewis DA, Moghaddam B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations [J]. *Arch Neurol*, 2006, 63(10):1372-1376
- [8] Volk DW, Austin MC, Pierri JN, et al. Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2000, 57(3):237-245
- [9] Benes FM. Nicotinic receptors and functional regulation of GABA cell microcircuitry in bipolar disorder and schizophrenia [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, 2(13):401-417
- [10] Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, et al. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance [J]. *Nature*, 2009, 459(7247):698-702
- [11] Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(43):11496-11500
- [12] Razoux F, Garcia R, Léna I. Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 32(3):719-727
- [13] Martisova E, Solas M, Horrillo I, et al. Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(5-6):1944-1953

- (03):132-177
Cao Qing-xuan. A case report of excessive mastoid pneumatisation [J]. Journal of Clinical Radiology, 1991, 10(03):132-177
- [3] 韩晓东, 牛广明, 董勤. 乳突气化过度致皮下气肿及自发性气脑一例报告[J]. 医学影像学杂志, 1996, 5(03):137
Han Xiao-dong, Niu Guang-ming, Dong Qin. A case report of excessive mastoid pneumatisation result in subcutaneous emphysema and spontaneous pneumocephalus [J]. Journal of Medical Imaging, 1996, 5(03):137
- [4] 李宝明, 周文光, 李幼娥. 乳突过度气化并发枕部气囊肿一例[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1994, 8(04):253
Li Bao-ming, Zhou Wen-guang, Li You-e. A case report of excessive mastoid pneumatisation concurrent occipital pneumatocele [J]. J Clin Otorhinolaryngol, 1994, 8(04):253
- [5] 刘文耀, 郑文辉. 颅骨过度气化症 [J]. 新疆医学院学报, 1982, 5(Z1):309
Liu Wen-yao, Zheng Wen-hui. Craniocervical bone pneumatisation [J]. Xinjiang medical journals, 1982, 5(Z1):309
- [6] 刘文耀, 郑文辉. 颅骨过度气化症 2 例报告[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1985, 11(05):271
Liu Wen-yao, Zheng Wen-hui. Craniocervical bone pneumatisation: two cases report[J]. Chin J Nerv Ment Dis, 1985, 11(05):271
- [7] 张汝华, 王凤琴. 乳突过度气化并发头顶枕部气囊肿致骨质缺损一例[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1995, 9(01):56
Zhang Ru-hua, Wang Feng-qin. A case report of excessive mastoid pneumatisation concurrent occipital pneumatocele result in bone defect [J]. J Clin Otorhinolaryngol, 1995, 9(01):56
- [8] Rebol J, Munda A, Tos M. Hyperpneumatization of the temporal, occipital and parietal bones[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2004, 261(8):445-448
- [9] Houet EJ, Kouokam LM, Nchimi AL. Skull base bone hyperpneumatization[J]. Jbr-btr, 2013, 96(3):185
- [10] Welker KM, DeLone DR, Lane JJ, et al. Arrested pneumatization of the skull base: imaging characteristics [J]. AJR Am J Roentgenol, 2008, 190(6):1691-1696
- [11] 林久祥. 口腔正畸学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011
Lin Jiu-xiang. Orthodontics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011
- [12] Wemhoff M, Jain R, Rock J. Hyperpneumatization of the skull base: case report [J]. Neurosurgery, 2012, 70 (3): E789-793; discussion E793-784
- [13] Germino JC, Medverd JR, Nguyen VT, et al. Craniocervical hyperpneumatization with concurrent pneumorrhachis, pneumomediastinum, and subcutaneous emphysema in a weightlifter [J]. Spine J, 2013, 13(10): e47-53
- [14] Zhang X, Jing M, Liang H, et al. Traumatic subperiosteal emphysema caused by hyperpneumatization of the temporal and occipital bone[J]. J Neuroimaging, 2013, 23(2):259-261
- [15] Turowski B, Rettig J, Raab P, et al. Cutaneous emphysema and craniocervical bone pneumatization [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2001, 22(7):1398-1400
- [16] Weber AL. Imaging of the skull base [J]. Eur J Radiol, 1996, 22(1): 68-81
- [17] Lacout A, Marcy PY, Carlier RY, et al. Pneumatization of the skull base due to valsalva maneuver [J]. Cleft Palate Craniofac J, 2013, 50(1):113-116
- [18] Petritsch B, Hahn D, Wendel F, et al. Dens fracture in a patient with extensive craniocervical bone pneumatization[J]. Diagn Interv Radiol, 2012, 18(5): 517-518
- [19] Moss M, Biggs M, Fagan P, et al. Complications of occipital bone pneumatization[J]. Australas Radiol, 2004, 48(2):259-263
- [20] Park P, Chandler WF, Telian SA, et al. Spontaneous chronic epidural pneumocephalus resulting from hyperpneumatization of the cranium causing mass effect: case report[J]. Neurosurgery, 1998, 42(6):1384-1386
- [21] Tuz M, Dogru H, Yesildag A. Subjective pulsatile tinnitus associated with extensive pneumatization of temporal bone [J]. Auris Nasus Larynx, 2003, 30(2):183-185
- [22] 陈硕, 邱治民, 邹宁生. 人面神经管和面神经的发生[J]. 解剖学报, 1988, 19(03):327-331+355
Chen Shuo, Qiu Zhi-min, Zou Ning-sheng. Development of facial nerve canal and facial nerve in Human [J]. Acta Anatomica Sinica, 1988, 19(03): 327-331+355
- [23] Hasnaini M, Ng SY. Extensive temporal bone pneumatization: incidental finding in a patient with TMJ dysfunction [J]. Dent Update, 2000, 27(4):187-189

(上接第 3222 页)

- [14] Sequeira A, Mamdani F, Ernst C, et al. Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression [J]. PLoS One, 2009, 4(8):e6585
- [15] Goff DC, Coyle JT. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia [J]. Am J Psychiatry, 2001, 158(9):1367-1377
- [16] Arrue A, Davila R, Zumarraga M, et al. GABA and homovanillic acid in the plasma of Schizophrenic and bipolar I patients [J]. Neurochem Res, 2010, 35(2):247-253
- [17] Zhang ZJ, Reynolds GP. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia [J]. Schizophr Res, 2002, 55(1-2):1-10
- [18] Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(4):312-324
- [19] Fatemi SH, Sary JM, Earle JA, et al. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum[J]. Schizophr Res, 2005, 72(2-3):109-122
- [20] Cai HL, Zhu RH, Li HD, et al. Elevated plasma gamma-aminobutyrate/glutamate ratio and responses to risperidone antipsychotic treatment in schizophrenia [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010, 34(7):1273-1278