DOI:10.16016/j.1000-5404.201509051

丙泊酚对发育期小鼠大脑梨状皮层神经前体细胞增殖的影响

余 丹,景 胜,黄 静,包晓航,杨天德 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院麻醉科)

[摘要] **目的** 探讨丙泊酚对新生小鼠大脑梨状皮层神经前体细胞增殖的影响。**方法** 选取健康同窝、日龄为 7 d(P7)的 C57 小鼠 15 只,按照随机数字表法分为 3 组:对照组,丙泊酚低剂量(30 mg/kg)组,丙泊酚高剂量(60 mg/kg)组,所有小鼠从 P7 开始接受药物处理。高、低剂量组分别腹腔注射丙泊酚 60、30 mg/kg,对照组腹腔注射相同体积 10% 脂肪乳。药物处理后 24 h(P8)腹腔注射 BrdU 50 mg/kg,2 h 后取材,采用免疫组织化学法检测梨状皮层细胞增殖标记物 BrdU、Sox_2 及神经干细胞纤维突起标记物 Nestin 的表达。**结果** 与对照组(42.67 ± 2.41)比较,丙泊酚低剂量组(33.84 ± 1.33)及高剂量组(25.17 ± 1.73)新生小鼠大脑梨状皮层中 $BrdU^+$ 细胞数量明显减少;与低剂量组比较,高剂量组 $BrdU^+$ 细胞数量减少更明显($P<0.05$);免疫组化结果显示:丙泊酚低剂量组 Sox_2 标记的神经祖细胞数(558.94 ± 29.85)较对照组(618.67 ± 24.01)差异无统计学意义($P>0.05$),但丙泊酚高剂量组(430.83 ± 29.23)较对照组、丙泊酚低剂量组均减少($P<0.01$,$P<0.05$)。丙泊酚低剂量组(24.73 ± 0.69)与对照组(34.81 ± 2.56)比较,BrdU-Sox_2 双标阳性细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$);但丙泊酚高剂量组(12.48 ± 0.80)较对照组及丙泊酚低剂量组均减少($P<0.01$,$P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示:与对照组(1.00 ± 0.00)比较,丙泊酚低剂量组(0.65 ± 0.07)及高剂量组(0.60 ± 0.08)Nestin 标记的神经干细胞纤维突起灰度值降低,纤维分布稀疏且排列紊乱($P<0.01$)。**结论** 丙泊酚可抑制新生小鼠大脑梨状皮层神经前体细胞增殖,并呈一定剂量相关性。

[关键词] 丙泊酚;神经毒性;梨状皮层;细胞增殖
[中图法分类号] R322.81;R329.28;R971.2 [文献标志码] A

Effect of propofol on proliferation in neural precursor cells of developing mouse piriform cortex

Yu Dan, Jing Sheng, Huang Jing, Bao Xiaohang, Yang Tiande (Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of propofol on the proliferation of neural precursor cells (NPCs) of piriform cortex in neonatal mice. **Methods** Fifteen healthy 7-day-old C57 mice from the same litters were randomly divided into 3 groups, that is, control group, low- (30 mg/kg) and high-dose propofol groups (60 mg/kg). The animals of the 2 latter groups were treated with corresponding drugs on postnatal days 7 (P7) by intra-peritoneal injection, while those of the control group were injected with the same volume of 10% intralipid. They were given intra-peritoneal injection of 50 mg/kg BrdU on P8, and then were sacrificed in 2 h for brain tissue. Immunohistochemical assay was used to detect the expression of BrdU, Sox_2 and Nestin (neural stem cell marker) in piriform cortex. **Results** Compared with the control group (42.67 ± 2.41), the number of BrdU-positive cells in piriform cortex was significantly less in the low- (33.84 ± 1.33, $P<0.05$) and high-dose propofol groups (25.17 ± 1.73, $P<0.01$), with that of the high-dose group obviously decreased than that of low-dose group ($P<0.05$). There as no significant change in the

[通信作者] 杨天德,E-mail:31011@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160128.1701.001.html(2016-01-28)

number of Sox_2-positve cells in piriform cortex of the low-dose propofol group (558.94 ± 29.85) and the control group (618.67 ± 24.01, $P>0.05$), but that of the high-dose propofol group (430.83 ± 29.23) was remarkably lower than those of the low-dose ($P<0.01$) and control group ($P<0.01$). Further more, the number of BrdU-Sox_2 double positive cells were not significant decreased after low-dose propofol treatment (24.73 ± 0.69) compared with the control group (34.81 ± 2.56, $P>0.05$), while the high-dose treatment significantly decreased the number as compared with that in the control group (12.48 ± 0.80, $P<0.01$) and the low-dose group ($P<0.05$). Propofol treatment at lower (0.65 ± 0.07) and high dose (0.60 ± 0.08) decreased the optical density of the fibers of Nestin-labeled neural stem cells when compared with control group (1.00 ± 0.00, $P<0.01$). **Conclusion** Propofol inhibites the NPCs proliferation in piriform cortex of newborn mice in a related manner.

[**Key words**] propofol; neurotoxicity; piriform cortex; cell proliferation

Corresponding author: Yang Tiande, E-mail: 31011@sina.com

麻醉药物对婴幼儿认知、记忆的影响是人们关注与争议的热点。临床回顾性研究表明:2 岁以下婴幼儿在接受全身麻醉后可导致较长时间的行为及人格改变,提示全麻药物可能损伤婴幼儿的中枢神经系统[1]。丙泊酚作为一种新型的快速、短效的全身麻醉药之一,起效迅速、苏醒快、作用时间短、术后恶心呕吐发生率低,被广泛运用于临床麻醉的诱导和维持及ICU 镇静。然而,丙泊酚引发神经毒性的机制尚未可知。

梨状皮层(piriform cortex)起源于古皮质,同海马区一样属于边缘系统,它与神经发生和学习记忆密切相关。2001 年,Thompson 等[2]证实尿烷麻醉后可导致新生 SD 大鼠大脑梨状皮层选择性的神经元凋亡。Kajiwara 等[3]最新的研究也同样证实梨状皮层是麻醉药物作用的关键位点。丙泊酚是否通过调节发育期大脑梨状皮层的细胞增殖,从而影响远期脑功能尚未明确。本研究采用免疫组织化学法检测不同剂量的丙泊酚对梨状皮层细胞增殖的影响,进一步探讨丙泊酚对发育大脑潜在的神经毒性作用可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

丙泊酚购自 AstraZenenca 公司(批号:KV697);10%脂肪乳购自安徽丰原药业股份有限公司;5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2-deoxyUridine,BrdU)粉剂购自 Sigma 公司;BrdU 抗体购自 BD Pharmingen 公司;Sox_2[Sex-determining region Y (SRY)-box 2]抗体购自 Chemicon 公司;Nestin 抗体购自 BD Pharmingen 公司。荧光二抗、生物素化二抗购自 Invitrogen 公司;SABC 试剂盒购自 Vector 公司。DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司。仪器:冰冻切片机为 Leica CM1950 型;照相仪器为 ZEISS AX10 型。

1.2 方法

1.2.1 动物与分组 健康 C57BL/6J 临产孕鼠由第三军医大学实验动物中心提供,4 月龄,体质量 26 ~ 32 g,18 ~ 22 ℃饲养,自然昼夜交替采光,自由充足摄取食物和水,小鼠出生后第 1 个 24 h 记为 P0。将日龄 7 d(P7)同窝小鼠 15 只按照随机数字表法分为 3 组($n=5$):对照组、丙泊酚低剂量组及高剂量组。

1.2.2 药物处理 于 P7 时,对照组小鼠腹腔注射 10%脂肪乳剂(10%脂肪乳为丙泊酚溶剂),低剂量组小鼠腹腔注射丙泊酚 30 mg/kg,高剂量组小鼠腹腔注射丙泊酚 60 mg/kg。药物注射后继续饲养至 P8,注射 BrdU 后 2 h,断头处死各组小鼠并取脑组织。

1.2.3 免疫组织化学和免疫荧光法 取材后,将小鼠脑标本置于新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,随后将脑标本转移至 30% 的蔗糖溶液中,待其充分脱水沉底后,使用 Leica 冰冻切片机以 40 μm 切片并转移至防冻液 -20 ℃保存备用。选取合适的切片于 0.01 mol/L PBS 漂洗后,2 mol/L HCl 37 ℃反应 30 min 后 PBS 漂洗(仅 BrdU 有此步骤),3% H_2O_2 溶液 37 ℃孵育 30 min,PBS 漂洗后 0.3% triton X-100 37 ℃ 反应 30 min,3%胎牛血清(BSA)封闭反应 1 h。分别加入小鼠来源的一抗工作液 BrdU(1∶500),兔来源的 Sox_2(1∶800),BrdU 与 Sox_2 一抗混合液,以及小鼠来源的 Nestin(1∶500),4 ℃孵育过夜。PBS 漂洗后分别加入生物素化的抗小鼠、抗兔 IgG,抗小鼠 Cy3 与抗兔 488 荧光二抗混合液及抗小鼠 488 标记的荧光二抗,并置于 37 ℃孵育 2 h; PBS 漂洗后加入链霉亲和

素-生物素复合物(SABC)37 ℃反应 1 h;PBS 漂洗后 DAB 显色,自然风干,中性树胶封片。BrdU-Sox_2、Nestin 免疫荧光二抗孵育后,PBS 漂洗 3 次,DAPI 染色,PBS 清洗 3 次后漂片,风干,荧光封片剂封片。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示,采用单因素方差分析及组间 LSD 多重比较。

2 结果

2.1 丙泊酚抑制发育期小鼠梨状皮层 BrdU 标记的细胞增殖

BrdU 注射后 2 h,在 P8 小鼠大脑梨状皮层区域可观察到 BrdU 免疫阳性细胞增殖现象。选取梨状皮层区域大小相似切片各 3 张,每张切片选取 3 个相同面积的区域,在显微镜下统计该区域 10^5 μm^2 中 $BrdU^+$ 细胞数量(图 1)。丙泊酚低剂量组(33.84 ± 1.33)与对照组(42.67 ± 2.41)比较,$BrdU^+$ 细胞数量明显减少($P<0.05$);与对照组和低剂量组比较,丙泊酚高剂量组(25.17 ± 1.73)$BrdU^+$ 细胞数量均减少($P<0.01$,$P<0.05$)。

2.2 丙泊酚减少发育期小鼠梨状皮层 Sox_2 标记的神经祖细胞数量

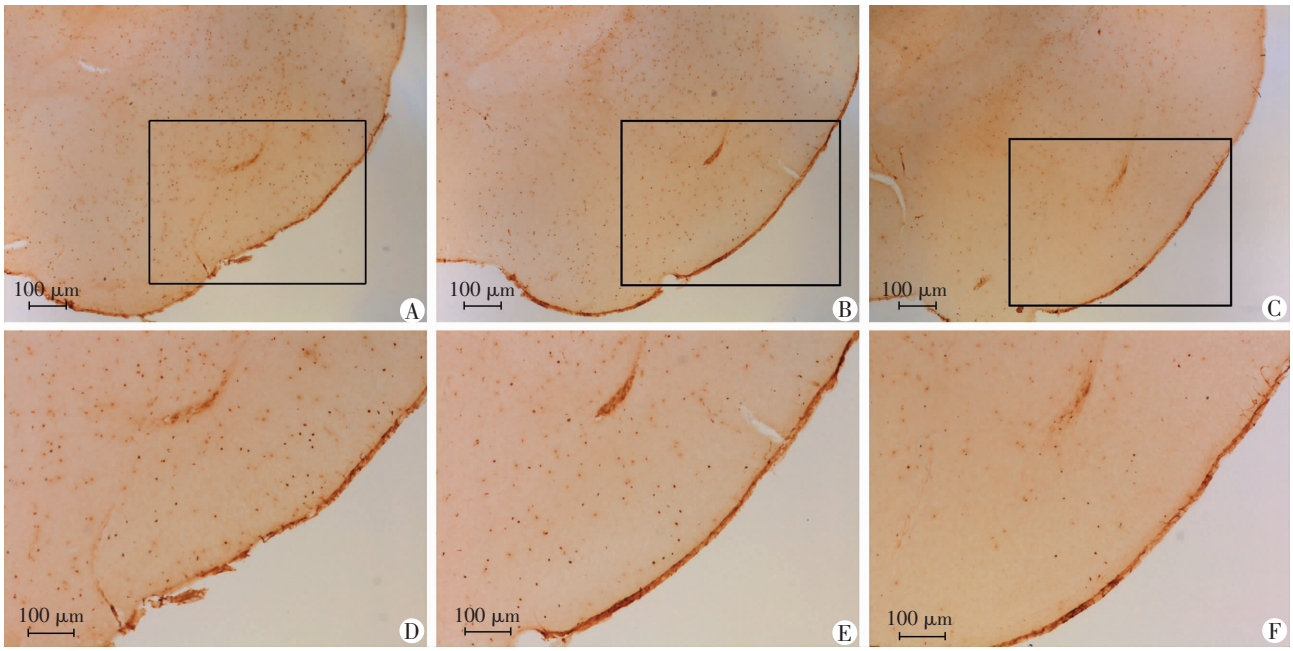
选取梨状皮层区域大小相似切片各 3 张,每张切片选取 3 个相同面积的区域,在显微镜下统计该区域 10^5 μm^2 中 Sox_2^+ 细胞数量(图 2)。与对照组(618.67 ± 24.01)比较,丙泊酚低剂量组(558.94 ± 29.85)Sox_2^+ 细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$),丙泊酚高剂量组(430.83 ± 29.23)则减少($P<0.01$)。与低剂量组比较,丙泊酚高剂量组 Sox_2^+ 细胞数量明显减少($P<0.05$)。

2.3 丙泊酚对梨状皮层 BrdU-Sox_2 双标阳性细胞的影响

BrdU-Sox_2 双重标记荧光染色以标记增殖的神经祖细胞,显微镜下统计该区域 10^5 μm^2 中的 BrdU-Sox_2 双标阳性细胞数量(图 3)。结果显示:与对照组(34.81 ± 2.56)比较,丙泊酚低剂量组(24.73 ± 0.69)BrdU-Sox_2 双标阳性细胞数量无明显差异($P>0.05$),丙泊酚高剂量组(12.48 ± 0.80)则明显减少($P<0.01$)。与低剂量组比较,丙泊酚高剂量组 BrdU-Sox_2 双标阳性细胞数量明显减少($P<0.05$)。

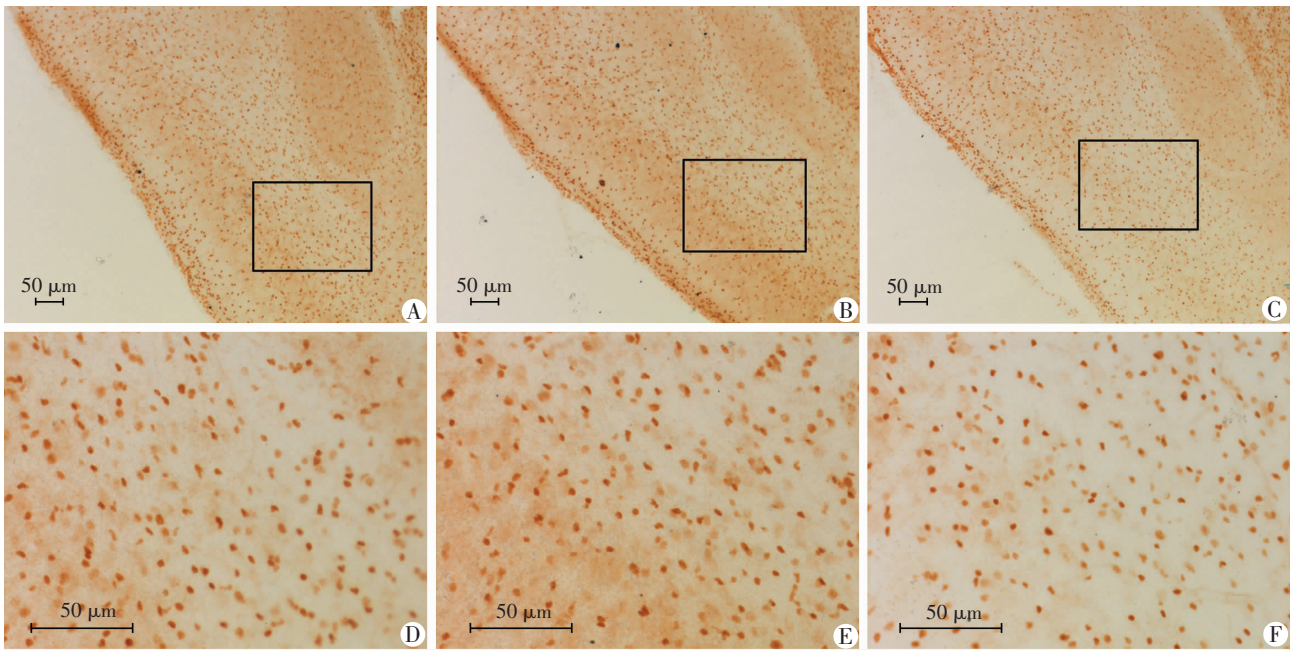
2.4 丙泊酚对梨状皮层 Nestin 标记的神经干细胞纤维的影响

巢蛋白 Nestin 可以标记神经干细胞的长纤维。选取梨状皮层区域大小相似切片各 3 张,在显微镜下通过光密度分析 Nestin 标记的神经干细胞纤维突起(图 4)。结果显示:丙泊酚低剂量组(0.65 ± 0.07)及高剂量组(0.60 ± 0.08)与对照组(1.00 ± 0.00)比较,Nestin 标记的神经干细胞纤维突起灰度值降低,纤维分布稀疏且排列紊乱($P<0.01$)。



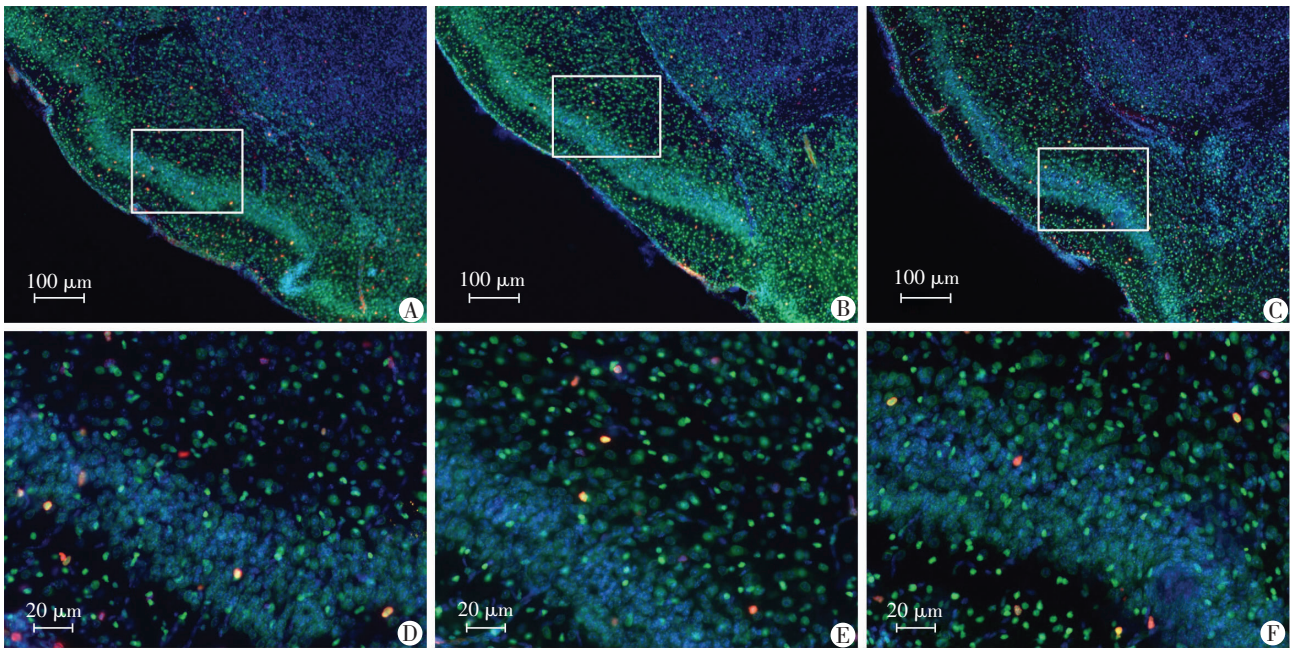
A、D:对照组;B、E:丙泊酚低剂量组;C、F:丙泊酚高剂量组;D ~ F:A ~ C 中的局部放大

图 1 丙泊酚对发育小鼠梨状皮层 BrdU 标记的细胞增殖的影响 (SABC)



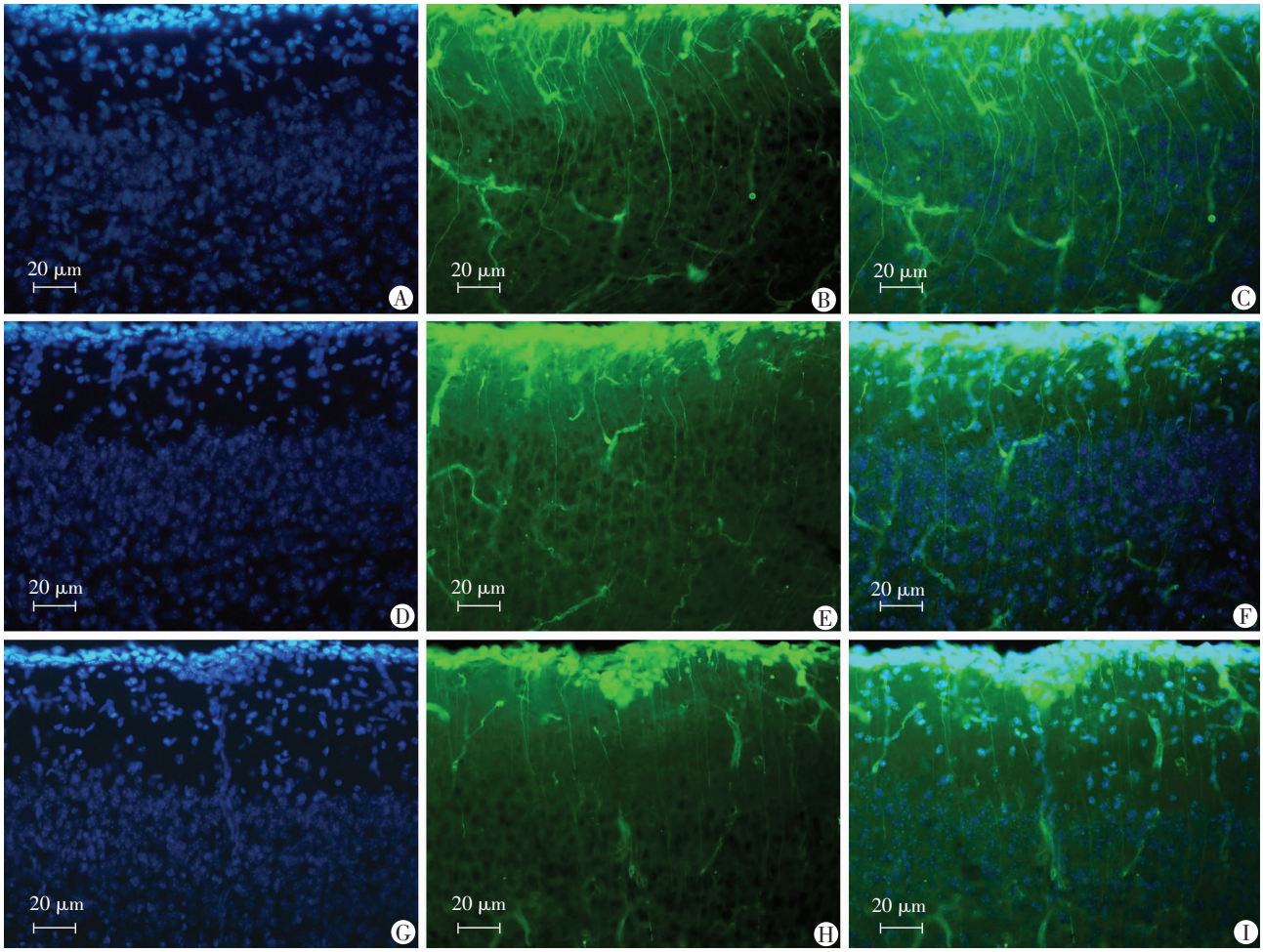
A、D:对照组;B、E:丙泊酚低剂量组;C、F:丙泊酚高剂量组;D~F:A~C 中的局部放大

图 2　丙泊酚减少发育小鼠梨状皮层 Sox_2 的表达　(SABC)



A、D:对照组;B、E:丙泊酚低剂量组;C、F:丙泊酚高剂量组; D~F:A~C 中的局部放大

图 3　免疫荧光染色观察丙泊酚对梨状皮层 BrdU-Sox_2 双标阳性细胞的影响



A、B、C:对照组;D、E、F:丙泊酚低剂量组;G、H、I: 丙泊酚高剂量组;A、D、G:DAPI 染色;D、E、F:Nestin 染色;C、F、I:合成图

图 4 免疫荧光染色观察丙泊酚对梨状皮层 Nestin 标记的神经干细胞纤维的影响

3 讨论

大脑发育是一个漫长且错综复杂的过程,快速发育期的大脑对外界的刺激尤为敏感[4]。近年来,全麻药物对发育机体中枢神经系统的毒性作用越来越引人注目。临床研究表明 4 岁前多次麻醉暴露可增加认知功能障碍的发生率[5];啮齿类动物实验研究表明单次剂量或重复剂量的丙泊酚麻醉可导致发育期大脑的神经元凋亡[6-7]。然而,丙泊酚所致的神经毒性作用除了涉及神经元凋亡外,有无通过调控细胞增殖影响大脑发育的可能性呢?

梨状皮层和海马区一样属于边缘系统,是哺乳动物最大的嗅皮层,由嗅球通过外侧嗅束直接传入,并与相邻皮层及海马之间形成复杂的纤维连接[8]。梨状皮层大部分的神经元于胚胎 14 ~ 18 d 产生[9],更有研究发现成年后梨状皮层仍然存在新生神经元的产生[10]。某些慢性刺激可以减少梨状皮层的神经发生[11],这似乎可以解释抑郁症患者并发嗅觉功能障碍[12]。梨状皮层不仅参与嗅觉信息的传递,与记忆的形成及某些疾病的发生密切相关,如在阿尔茨海默症及帕金森病等神经退行性疾病的病理发生过程中均发现梨状皮层功能异常[13]。由此可见,梨状皮层的发育与学习、认知及记忆的形成密切相关。

BrdU 是一种胸腺嘧啶核苷的类似物,DNA 合成期(S 期)可代替胸腺嘧啶。BrdU 活体注射是标记以及定量分析活体、培养细胞等细胞增殖的常规技术。本研究发现:不同剂量的丙泊酚对梨状皮层细胞增殖影响不同。与对照组相比,低剂量丙泊酚即可减少梨状皮层 BrdU 标记的增殖细胞数量($P<0.05$),高剂量丙泊酚组对梨状皮层细胞增殖的抑制效应则更为显著($P<0.01$),同时高剂量丙泊酚较低剂量丙泊酚对梨状皮层细胞增殖具有显著抑制作用($P<0.05$)。提示

丙泊酚可抑制梨状皮层细胞增殖,并呈一定的剂量相关性。转录因子 Sox_2 作为神经干细胞关键的调节因子,在神经祖细胞上高表达[14]。Sox_2 可激活如巢蛋白(nestin)及音猬因子(sonic hedgehog)等靶基因以维持神经祖细胞的特性,包括增殖及自我更新的能力[15]。为了评估丙泊酚对新生小鼠梨状皮层的神经祖细胞的影响,我们对比3组间 Sox_2^+ 细胞数量。研究发现高剂量丙泊酚暴露可显著减少梨状皮层 Sox_2^+ 细胞数量($P<0.01$),而低剂量丙泊酚对 Sox_2^+ 细胞数量无明显抑制作用($P>0.05$)。因此,高剂量丙泊酚暴露可减少梨状皮层 Sox_2^+ 细胞数量。BrdU-Sox_2 双标阳性细胞反应增殖的神经前体细胞,本研究发现高剂量丙泊酚暴露可显著减少梨状皮层 BrdU-Sox_2 双标阳性细胞数量($P<0.01$),而低剂量丙泊酚组则无明显改变。

Nestin 是一种中间丝类型的蛋白,是神经干细胞的特征性标记物。出生后第7天是大脑发育的关键期,Nestin 标记的神经干细胞纤维突起广泛表达于大脑皮层。为了评估丙泊酚对梨状皮层神经干细胞纤维突起的影响,我们通过光密度分析 Nestin 免疫荧光染色指标。结果显示:与对照组比较,低剂量丙泊酚即可减少梨状皮层 Nestin 标记的神经干细胞纤维($P<0.01$),低剂量丙泊酚组与高剂量丙泊酚组则无明显差异。提示低剂量丙泊酚可抑制梨状皮层神经干细胞纤维突起的发育。

综上所述,高剂量丙泊酚可明显抑制发育期小鼠大脑梨状皮层的神经前体细胞增殖以及梨状皮层神经干细胞纤维突起的发育。因此,我们推测发育期丙泊酚麻醉存在潜在的副作用,这可能与丙泊酚的神经毒性作用相关。

参考文献:

[1] DiMaggio C, Sun L S, Li G. Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort[J]. Anesth Analg, 2011, 113(5): 1143-1151. DOI:10.1213/ANE.0b013e3182147f42

[2] Thompson K W, Wasterlain C G. Urethane anesthesia produces selective damage in the piriform cortex of the developing brain[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 130(2): 167-171.

[3] Kajiwara R, Takashima I. Early exposure to urethane anesthesia: Effects on neuronal activity in the piriform cortex of the developing brain[J]. Neurosci Lett, 2015, 600: 121-126. DOI:10.1016/j.neulet.2015.06.012

[4] Jevtovic-Todorovic V, Hartman R E, Izumi Y, *et al*. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits[J]. J Neurosci, 2003, 23(3): 876-882.

[5] Wilder R T, Flick R P, Sprung J, *et al*. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort[J]. Anesthesiology, 2009, 110(4): 796-804. DOI:10.1097/01.anes.0000344728.34332.5d

[6] Yu D, Jiang Y, Gao J, *et al*. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats[J]. Neurosci Lett, 2013, 534: 41-46. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.033

[7] Cattano D, Young C, Straiko M M, *et al*. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain[J]. Anesth Analg, 2008, 106(6): 1712-1714. DOI:10.1213/ane.0b013e318172ba0a

[8] Pekcec A, Loscher W, Potschka H. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex[J]. Neuroreport, 2006, 17(6): 571-574.

[9] Bayer S A. Neurogenesis in the rat primary olfactory cortex[J]. Int J Dev Neurosci, 1986, 4(3): 251-271.

[10] Yuan T F, Liang Y X, So K F. Occurrence of new neurons in the piriform cortex[J]. Front Neuroanat, 2015, 8: 167. DOI:10.3389/fnana.2014.00167

[11] Nacher J, Pham K, Gil-Fernandez V, *et al*. Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex[J]. Neuroscience, 2004, 126(2): 503-509. DOI:10.1016/j.neuroscience.2004.03.038

[12] Yuan T F, Slotnick B M. Roles of olfactory system dysfunction in depression[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014, 54: 26-30. DOI:10.1016/j.pnpbp.2014.05.013

[13] Li J, Cui Y, Yuan T F, *et al*. Commentary: olfactory dysfunction in Parkinson's disease[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12(8): 1079-1080.

[14] Pevny L H, Nicolis S K. Sox2 roles in neural stem cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(3): 421-424. DOI:10.1016/j.biocel.2009.08.018

[15] Bonaguidi M A, Wheeler M A, Shapiro J S, *et al*. *In vivo* clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics[J]. Cell, 2011, 145(7): 1142-1155. DOI:10.1016/j.cell.2011.05.024

(收稿:2015-09-09;修回:2015-10-24)

(编辑 王 红)