基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1175-04

丙泊酚对新生鼠大脑皮层神经元存活及凋亡的影响

杨 坤,金先庆,陈廷福,赵丽华
(重庆医科大学附属儿童医院普外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨丙泊酚对新生鼠大脑皮层神经元存活及凋亡的影响。方法:取新生 1 d 内的 SD(Sprague-dawley)大鼠的皮层神经元,培养 6 d,应用免疫细胞化学法及电子显微镜鉴定神经元,用不同浓度的丙泊酚作用神经元不同时间,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测细胞存活率,TUNEL 染色法测细胞凋亡指数,Western-blot 免疫印记检测 Cleaved-caspase3 蛋白的表达。结果:丙泊酚作用 12 h 后,细胞存活率在 6 个组中无明显变化,作用 24 h 及 48 h 后,较高浓度组细胞存活率降低趋势明显。且较高浓度作用于神经元 24 h 后凋亡指数及 Cleaved-caspase3 蛋白的表达均呈浓度依赖性增高($P<0.05$)。结论:高浓度长时间丙泊酚作用于大脑皮层神经元可降低其存活力和促进细胞凋亡,这一结论对临床儿童麻醉用药有指导意义。

【关键词】丙泊酚;皮层神经元;细胞存活率;凋亡;TUNEL; Cleaved-caspase3
【中国图书分类法分类号】R971+.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-18

Effects of propofol on cell viability and apoptosis in primary cultured cortical neurons of newborn rats

YANG Kun, et al
(*Department of General Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of propofol on cell viability and apoptosis in primary cultured cortical neurons of newborn rats. *Methods*: Primary culture was prepared from newborn rat, and cultured for 6 days. Immunocytochemical and electronic Micoscopic methods were used to identify the cultured neurons. Cells were treated by propofol with different concentrations and at different times. The effects of propofol on neurons were evaluated by cell viability (MTT assay) and markers of apoptosis (TUNEL cell staining and Western-blot of Cleaved-caspase3). *Results*: There were no significant differences in cell viability among the six groups after 12 h, whereas high concentration of propofol caused an increase in neuronal cell viability after 24 h and 48 h . Propofol incubation for 24 h triggered apoptosis on the neurons ($P<0.05$) and up regulated Cleaved-caspase3 of neurons in a concentration dependent manner($P<0.05$). *Conclusion*: Propofol treatment with long time and high concentration significantly decreased the cell viability and promoted the cell apoptosis. The present results offered guidance for children anesthesia in clinic.

【Key words】Propofol; Cortical neurons; Cell viability; Apoptosis; TUNEL; Cleaved-caspase3

近年来,丙泊酚由于起效快,消除迅速和不良反应少等优点而成为小儿外科手术中最常用的全麻药之一,但近期的一系列研究表明,拮抗 N- 甲基 D- 天(门)冬氨酸(NMDA)受体或过度兴奋 γ- 氨基丁酸 A 型($GABA_A$)受体的全麻药可触发处在快速发育期的大量神经细胞的凋亡及以后学习记忆方面的缺陷[1-4],丙泊酚的作用机制为共同作用于 NMDA 和 $GABA_A$ 受体[5,6],并有文献报道其与氯胺酮联合应用可诱导神经退行性变及随后的行为学改变,然而丙泊酚单独应用是否可诱发神经元凋亡还没有系统的评估[7],本研究拟探讨丙泊酚对新生鼠大脑皮层神经元存活及凋亡的影响。

作者介绍:杨 坤(1983-),女,硕士,
研究方向:儿童麻醉/肿瘤外科方面。
通讯作者:金先庆,男,教授,E-mail:XianqingJin2010@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供,雌雄合笼在层流架带盖鼠盒内饲养(符合 SPF 标准),实验时取新生大鼠(24 h 内)为实验材料。

1.2 实验试剂

丙泊酚(得普利麻 Diprivan,意大利 AstraZeneca 公司,批号:GA657),Neurobasal 培养基(美国 GIBGO 公司),B27(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(PAA 公司),神经元烯醇化酶(NSE)抗体(武汉博士德生物技术有限公司),MTT(美国 Sig-

ma 公司),Tunel 凋亡试剂盒(南京凯基公司),兔 caspase3 多克隆抗体(美国 Cell signaling 公司),蛋白裂解液(碧云天公司)。

1.3　大脑皮层神经元培养

根据 Isabelle 等[7]所用的方法加以改进,取 24 h 内 SPF 级新生 SD 大鼠,碘酊酒精消毒后断头,将鼠头移入超净台中预先盛有冰的 PBS 的培养皿中,无菌条件下剪开皮肤、颅骨,分离脑膜和血管,将大脑皮层分离后置于无血清 DMEM/F12 培养基中,剪成 1 mm^3 的组织块,胰酶充分消化后,经 200 目钢网过滤,4℃、1 000 r/min 离心 6 min,细胞重悬于含 Neurobasal+2%B27 的培养基,调整细胞密度为 2.0×10^5 个/ml,置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养,24 h 后用 Neurobasal+2%B27 全量换液,以后每隔 3～4 d 半量换液。

1.4　神经元鉴定及纯度测定

取出培养 6 d 的神经元爬片,浸入预冷的丙酮,固定 10 min,然后用正常山羊血清封闭 40 min,再滴加兔抗大鼠 NSE(神经元特异性烯醇化酶)单克隆抗体(1:200),置于湿盒内,放于 37℃ 5% CO_2 孵箱中孵育 40 min,PBS 清洗后滴加 SABC-Cy3 (1:100) 放于 37℃、5%CO_2 孵箱中孵育 40 min,然后再加入 1 μg/ml 的 DAPI 室温避光孵育 40 min,PBS 清洗 3 次,晾干后,用 50%缓冲甘油封片,在荧光显微镜 200 倍视野下每张细胞爬片随机取 5 个视野,每个视野分别用 WG 系统检测 Cy3 标记的 NSE 蛋白,用 WU 系统检测 DAPI 标记的细胞核。分别摄像后利用 SPOT3.4 软件进行同一视野的不同荧光通道的重叠,神经元纯度(%)= 阳性细胞数/该视野细胞总数。

1.5　MTT 检测细胞活性

96 孔板中,设置 6 个组,每组设置 3 个平行副孔。C_1 组不加任何处理,为对照组,$P_{1,2,3,4,5}$ 组加入丙泊酚,与培养基混合后终浓度分别为 2、5、10、20、50 μg/ml,设空白对照用于调零,放于 37℃、5% CO_2 的培养箱中,分别于给药 12、24、48 h 后加入 MTT10 μl/孔,继续于 CO_2 孵箱中孵育 4 h,吸去上清,再加入 DMSO 100 μl/孔,置于酶标仪上,在 570 nm 波长下测各孔的吸光度(OD 值),实验重复 3 次,求其平均值,对照组存活率为 100%,实验组神经元存活率 =(实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

1.6　TUNEL 染色检测细胞凋亡指数

24 孔板中培养 6 d 的神经元爬片,C_2 组不做任何处理,为对照组,Pi、Pii、Piii 组分别加入丙泊酚,终浓度分别为 10、20、50 μg/ml,每组重复 3 孔,孵育 24 h 后按南京凯基公司凋亡试剂盒说明检测每组的凋亡指数。分别设立阳性对照和阴性对照,细胞核染成棕黄色为凋亡细胞,倒置显微镜下随机取 5 个视野观察阳性细胞并计数,取平均值,计算出细胞凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数 ÷ 细胞总数)×100%。

1.7　Western-blot 测 Cleaved-caspase3 蛋白的表达

皮层神经元培养 6 d 后,C_3 组不做任何处理,为对照组,$P_Ⅰ$、$P_Ⅱ$和 $P_Ⅲ$组分别加入丙泊酚,终浓度为 10、20、50 μg/ml,作用 24 h 后用细胞裂解液充分裂解后提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度,蛋白样品以 15%SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干转转移至 PVDF 膜,室温下用 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后加入一抗(兔 caspase3 多克隆抗体 1:1 000)于 4℃孵育过夜,TBST 缓冲液洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,于室温孵育 1.5 h,洗膜,ECL 化学发光剂曝光显影,以 β-action 为内参,结果经 Quantity One 软件处理,各组以 Cleaved-caspase3 与 β-action 条带灰度值的比值作为 Cleaved-caspase3 蛋白的相对表达量。

1.8　统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　神经细胞原代培养

倒置显微镜下观察,初接种的神经细胞呈圆形,无突起,3 h 后细胞开始贴壁,细胞折光性强,少数神经细胞有突起伸出,24 h 后细胞贴壁完全。原代培养 6 d 的细胞,胞体较大成圆形,细胞边缘光滑,多成梭状,锥状,立体感强,神经元突起较长连成网络(见图 1)。

2.2　免疫荧光鉴定皮层神经元

在荧光显微镜下,用 WG 系统检测 Cy3 标记的 NSE 蛋白,显示为胞浆内明亮的红色丝状或颗粒状沉淀物;用 WU 系统检测 DAPI 标记的细胞核显示明亮的蓝色;同一视野下,被荧光双标的细胞占细胞总数 95%以上(见图 2～4)。

2.3　MTT 法检测丙泊酚体外作用对原代培养大脑皮层神经元存活的影响

丙泊酚作用 12 h 后,检测结果无明显变化,作用 24 h 后,药物浓度为 10、20、50 μg/ml 组神经元存活率分别降低至 70%、66%、56%,作用 48 h 后 3 个浓度组细胞存活率降低

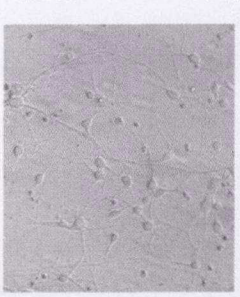


图 1　培养 6 d 的神经元(×200)



图 2　Cy3 标记的 NSE 蛋白(×200)

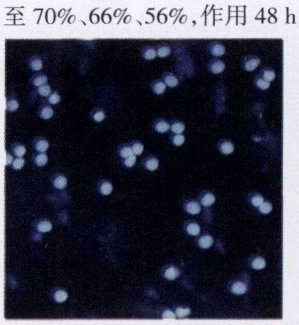


图 3　同一视野下 DAPI 标记的细胞核

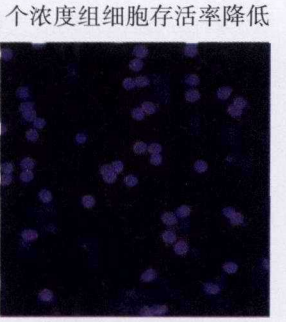


图 4　图 2 与图 3 重叠后的图片

趋势更为明显，分别为 64%、56%、40%(见图 5)。

2.4 TUNEL 染色测神经元凋亡

神经元经不同浓度丙泊酚处理 24 h 后，与 C_2 组比较 Pi、Pii、Piii 组神经元凋亡率均升高($P<0.05$)，且成浓度依赖性(见图 6~9 及表 1)。

2.5 Western blot 方法检测丙泊酚处理对皮层神经元中 Cleaved-caspase3 蛋白表达的影响

丙泊酚作用 24 h 可以引起皮层神经元中 Cleaved-caspase3 蛋白表达的增加($P<0.05$)，增加方式呈剂量依赖性(见图 10)。

3 讨 论

每年因外科手术、影像学诊断等原因有数百万儿童需要实施全身麻醉，丙泊酚作为静脉全麻药应用于临床已有二十几年的时间，虽然其所具有的优势毋庸质疑[7]，但在小儿静脉麻醉中的应用却一直受到限制，因为近年的众多研究显示高浓度长时间持续应用丙泊酚可引起神经退行性变及小儿惊厥的发生。目前丙泊酚对快速发育期的神经元是否有毒性作用，是否促进其凋亡已成为麻醉学、神经病学等研究领域关注的热点，但研究结果尚待进一步完善。因此本研究选用处于快速发育期的离体培养 6 d 的神经元作为研究对象，并选用不同浓度的丙泊酚和不同的作用时间对其进行药物干预，以研究丙泊酚对幼稚神经元的影响。

本实验 MTT 研究结果显示：当作用 24 h，丙泊酚浓度≥10 μg/ml 时细胞存活明显受到抑制，且随使用浓度增加、作用时间延长细胞存活率降低的趋势越明显，Honegger 等[8]的研究结果支持此结论，但 Laszlo 等[11]的研究显示丙泊酚浓度在 1~20 μg/ml 时并不影响神经元存活，其原因可能与神经元培养的种类及丙泊酚作用于神经元发育的时间点不同有关。

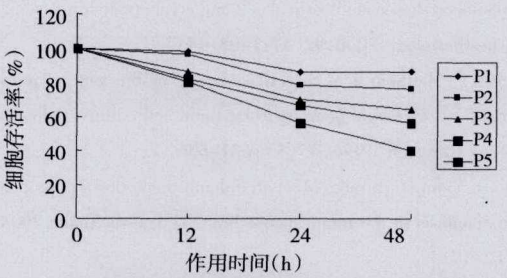


图 5 不同浓度丙泊酚在不同时间对神经元存活的影响

表 1 各组皮层神经元凋亡指数的比较(%，$\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡率
C_2	3.92 ± 0.24
P_i	6.94 ± 0.30*
P_{ii}	14.00 ± 0.43*
P_{iii}	18.88 ± 0.59*

* 与 C_2 对照组比较，$P<0.05$

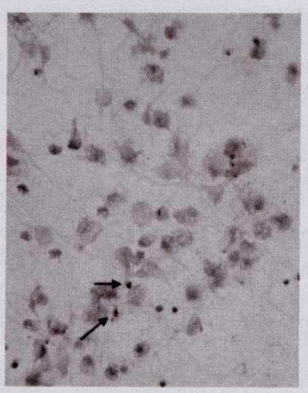


图 6 C_2 对照组(×400)

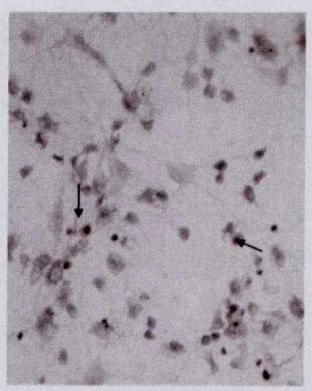


图 7 P_i 组 10 μg/ml (×400)

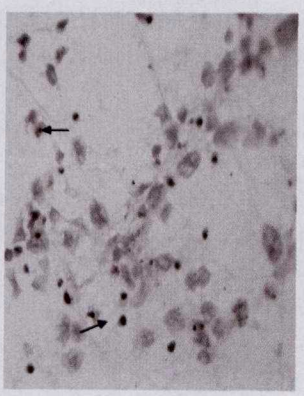


图 8 P_{ii} 组 20 μg/ml (×400)

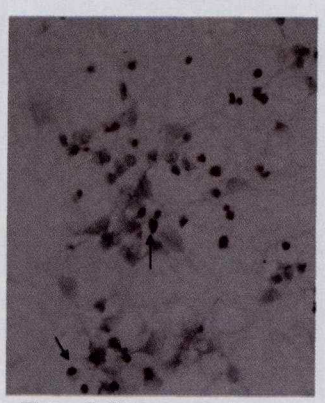
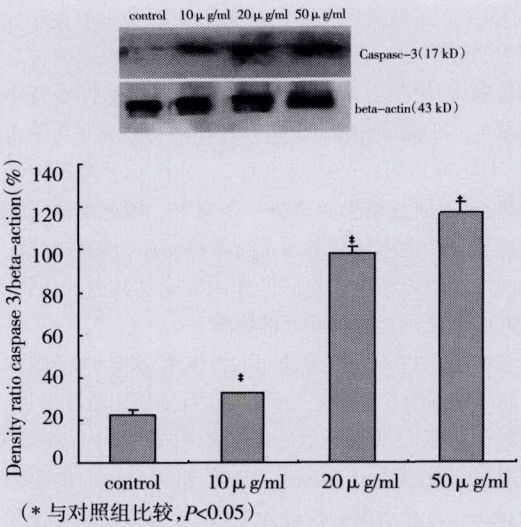


图 9 P_{iii} 组 50 μg/ml (×400)

注：箭头所指为神经元被染成棕黄色的细胞核



(* 与对照组比较，$P<0.05$)

图 10 作用 24 h 不同浓度丙泊酚对神经元中 Cleaved-caspase3 蛋白表达的影响

丙泊酚对大脑神经元存活抑制的明确机制目前尚未完全确定，大量研究显示其可能通过促进细胞凋亡发挥抑制作用。本研究 TUNEL 结果显示 10 μg/ml 丙泊酚就可引起大脑皮层神经元的明显凋亡，与国内外众多学者的初步研究相一致[8-10]。因在凋亡过程中，Caspase3 是最终执行者，哺乳动物神经元的凋亡可高表达 Cleaved-caspase3[12]，所以本实验通过检测 Cleaved-caspase3 蛋白的表达来进一步证实丙泊酚对神经元的抑制作用是通过促进其凋亡实现的，实验结果与 Vesna Pes 等[13]所进行的体内研究结果相符，均证实丙泊酚可呈浓度依赖性的引起 Cleaved-caspase3 增高，但导致 Cleaved-caspase3 增高的机制现在还不明确，可能在于丙泊酚通过调节 BDNF 或者 TNF-α 的表达从而激活两个经典凋亡途径即线粒体通路和死亡受体通路而实现[13-15]。

虽然药典提示丙泊酚慎用于 3 岁以下的患儿，但在临床工作中，丙泊酚还是广泛应用于各个年龄段的儿童。乙醇与丙泊酚都是共同作用于 NMDA 和 $GABA_A$ 受体，Chainllie Young 等[16]的研究显示乙醇对人类发育中的大脑有毒性作用，且可影响儿童成长过程中学习及记忆等方面的发展。丙泊酚对儿童是否也具有神经毒性还有待进一步探讨。

综上所述，丙泊酚可抑制神经元的存活、促进其凋亡，且抑制细胞存活和促进凋亡的程度与作用时间和浓度有关，这一结论为临床谨慎用药提供了可靠的理论依据。

参 考 文 献

[1] Fredriksson A, Ponten E, Gordh T, et al. Neonatal exposure to a combination of N-Metbyl-D-aspartate and γ-Aminobutyric acid type A receptor anestbetic agent potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent bebavioral defecits[J]. Anesthesiology, 2007, 107(3): 427-436.

[2] Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain[J]. Science, 1999, 283(5398): 70-74.

[3] Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru M J, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome[J]. Science, 2000, 287(5455): 1056—1060.

[4] Bittigau P, Sifringer M, Genz K, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurode-generation in the developing brain[J]. Proc Nat Acad Sci, 2002, 99(23): 15089-5094.

[5] Irifune M, Takarada T, Shimizu Y, et al. Propofol-induced anesthesia in mice is mediated by GABAA and excitatory amino acid receptors[J]. Anesth Analg, 2003, 97(2): 424-429.

[6] Kozinn J, Mao L, Arora A, et al. Inhibition of glutamatergic activation of extracellular signal-regulated protein kinases in hippocampal neurons by the intravenous anesthetic propofol[J]. Anesthesiology, 2006, 105(6): 1182-1191.

[7] Spahr' Schopfer I, Vutskits L, Toni N, et al. Differential neurotoxic effects of propofol on dissociated cortical cell and organotypic hippocampal cultures[J]. Anesthesiology, 2000, 92(5): 1408-1417.

[8] Honegger P, Matthieu J M. Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell culture[J]. Journal of Neuroscience Research, 1996, 45(5): 631-636.

[9] Cattano D, Young C, Straiko M, et al. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the Infant mouse brain[J]. Anesth Analg, 2008, 106(6): 1712-1714.

[10] 彭书俊，赵一凡，王寿平，等. 异丙酚对胎鼠离体海马神经元发育的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2008，28(5)：448-451.

[11] Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, et al. Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter in vitro dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons[J]. Anesthesiology, 2005, 102(5): 970-976.

[12] Young C, Roth K A, Klock B J, et al. Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration[J]. Neurobiology of Disease, 2005, 20(2): 608- 614.

[13] Pesic V, Milanovic D, Tanic N, et al. Potential mechanism of cell death in the developing rat brain induced by propofol anesthesia[J]. Int. J. Devl Neuroscience, 2009, 27 (3): 279-287.

[14] Yon J H, Daniel-Johnson J, Carter L B, et al. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways[J]. Neuroscience, 2005, 135(3): 815-827.

[15] Lu L X, Yon J H, Carter L B, et al. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis inthedeveloping rat brain[J]. Apotosis, 2006, 11(9): 1603-1615.

[16] Young C, Olney J W. Neuroapoptosis in the infant mouse braim triggered by a transient small increase in blood alcohol concentration[J]. Neurobiology of Disease, 2006, 22(3): 548-554.

(责任编辑：张学颖)