

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.18.001

布比卡因对高糖培养 SH-SY5Y 细胞毒性研究*

李亚文^{1,2}, 徐世元^{1△}, 张庆国¹, 李 乐¹, 赖露颖¹, 郑 艇¹, 苏娇玲², 杨耐梅², 李元涛²

(1. 南方医科大学珠江医院麻醉科, 广州 510282; 2. 南方医科大学附属

深圳妇幼保健院麻醉科, 广东深圳 518028)

[摘要] 目的 布比卡因作用高糖培养的 SH-SY5Y 细胞, 观测细胞内活性氧(ROS)及凋亡影响。方法 1 mmol/L 布比卡因作用不同浓度葡萄糖培养基培养的 SH-SY5Y 细胞 6 h, 检测细胞内 ROS、GRP78 水平变化及凋亡情况。结果 葡萄糖浓度为 7.80、11.10、13.30 mmol/L 组 ROS 产量均高于 5.56、6.10、7.00 mmol/L 组($P < 0.05$)。细胞凋亡率组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。GRP78 表达结果为 5.56 mmol/L 组(1.02 ± 0.12)、6.10 mmol/L 组(0.97 ± 0.06)、7.80 mmol/L 组(0.49 ± 0.04)、高于 7.00 mmol/L 组(0.46 ± 0.06); 11.10 mmol/L 组(0.22 ± 0.03)与 13.30 mmol/L 组(0.15 ± 0.07)低于其他各组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 细胞内 ROS 增多及凋亡增加与布比卡因增强细胞内质网应激(ERS)有关。GRP78 功能减弱进一步增强细胞 ERS。

[关键词] SH-SY5Y 细胞; 活性氧; 细胞凋亡; 神经毒性类

[中图分类号] R614

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)18-2449-02

Toxicity study on bupivacaine to SH-SY5Y cells cultured by high-glucose*

Li Yawen^{1,2}, Xu Shiyuan^{1△}, Zhang Qingguo¹, Li Le¹, Lai Luying¹, Zhang Ting¹, Su Jiaoling², Yang Naimei², Li Yuantao²

(1. Department of Anesthesiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China;

2. Department of Anesthesiology, Shenzhen Maternity and Children Hospital, Southern Medical

University, Shenzhen, Guangdong 518028, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the effect of bupivacaine on SH-SY5Y cells in high sugar environment and observe the ROS and apoptosis. **Methods** 1 mmol/L bupivacaine was added to medium with different concentrations of glucose for SH-SY5Y cells, and the quantity of ROS in the cells and the situation of apoptosis were detected by flow cytometry, and Western blot was used to detect the change of the related protein, GRP78. **Results** The contents of intracellular ROS in different groups, which had different concentration (7.80, 11.10, 13.30 mmol/L) of sugar medium, were high than those in groups with concentrations 5.56, 6.10, 7.00 mmol/L of sugar medium, and it showed statistical significance ($P < 0.05$). Cell apoptosis rates among different groups had statistical significance ($P < 0.05$). Expression of GRP78 in group of 5.56, 6.10 and 7.80 mmol/L were (1.02 ± 0.12), (0.97 ± 0.06) and (0.49 ± 0.04), respectively, and they all were higher than that in group of 7.00 mmol/L (0.46 ± 0.06). The groups of 11.10 mmol/L (0.22 ± 0.03) and 13.30 mmol/L (0.15 ± 0.07) were lower than the other groups in the expression of GRP78, and all the difference shows statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Increasing and apoptosis of intracellular ROS are associated with strengthened endoplasmic reticulum stress by bupivacaine. With the function degrading of GRP78, endoplasmic reticulum stress (ERS) may strengthen further.

[Key words] SH-SY5Y cell; reactive Oxygen species; apoptosis; neurotoxins

研究证实糖尿病患者接受椎管内阻滞麻醉或镇痛后, 其发生神经损伤的风险明显增加, 或加重原有多发性神经病变。而产妇产后妊娠期糖尿病发生率呈增高趋势^[1], 此类患者可能类同于糖尿病患者, 采用椎管内阻滞麻醉或镇痛可增加神经损伤的风险, 但神经损伤因素、机制及其与局部麻醉药的关系尚未明确。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与糖尿病代谢紊乱有关。妊娠期糖尿病母体高血糖状态下内源性活性氧(ROS)生成增加, 损伤细胞抗氧化能力, 导致氧化应激。在糖尿病病理状态下, 不同组织(包括神经)均可产生 ROS, 长期过量 ROS 积累引起慢性氧化应激, 引起神经组织毒副作用。因此本研究在高糖环境下培养 SH-SY5Y 细胞, 建立高糖细胞损伤模型, 加入布比卡因, 研究 ERS 细胞内 ROS 产量与细胞凋亡, 探讨高糖环境与布比卡因神经毒性作用的关系。目的在于为解决妊娠期糖尿病局部麻醉药神经毒性防治提供理论依据,

而有关这方面的研究目前尚未见报道。

1 材料与方

1.1 材料 DMEM/F12 培养基、DMEM 低糖培养基、胎牛血清(Gibco 公司, 美国), SHSY-5Y 细胞株(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心), 酶标仪(Bio-Tek 公司, 美国), 倒置荧光显微镜(Nikon 公司, 日本), 流式细胞仪(FCM, Becton Dickinson 公司, 美国), BG-Power600i 电泳仪(百晶生物技术公司, 北京), 暗匣(粤华医疗器械厂, 汕头), 聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Millipore 公司, 德国), 高速离心机(Eppendorf 公司, 德国), 超净工作台(苏州医疗器械厂, 苏州)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 (1)从液氮罐中取出含有细胞的冻存管, 立即置于 37 °C 水浴中, 轻轻摇动, 使其尽快融化; (2)从水浴中取出冻存管, 用乙醇消毒后打开, 用吸管吸出细胞悬液, 加入 10

mL 含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,置于离心管中混合后,1 000 r/min 离心 5 min;(3)弃上清,再重复用培养液洗 1 次;(4)用培养液重悬细胞,接种至 25 cm² 培养瓶,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养,次日更换培养液,以后每 2 天换液 1 次;(5)当细胞将要长满瓶底时,弃培养液,加入少量的胰蛋白酶细胞消化液消化数分钟后,在倒置显微镜下观察细胞状态。当细胞变圆时,立即加入含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,加入消化液,用吸管轻轻吹打,吸出细胞,计数,接种于新的培养瓶或培养板中。

1.2.2 细胞内 ROS 产量变化检测 将 SH-SY5Y 细胞按 5×10⁵/孔接种于 4 个 6 孔培养板。设立对照(5.56 mmol/L)、阳性(6.10、7.00、7.80、11.10、13.30 mmol/L)、阴性(仅加培养基)和空白组(反加 PBS)。其中两板培养 1 d 后各孔换各自含糖液继续培养 1 d。其余两板培养 1 d 后各孔换各自含糖液继续培养过夜,再经含 1 mmol/L 布比卡因培养液培养 6 h。消化细胞,EP 管收集,1 000 r/min 离心 5 min,去上清。按照 1:1 000 用 PBS 液稀释荧光探针 DCFH-DA,使其终浓度为 10 μL/L。去除细胞培养液,加入适量 DCFH-DA 于有培养液各孔,37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min,用 PBS 液洗细胞 3 次以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。重悬细胞。FCM 检测细胞内荧光强度。

1.2.3 FCM 检测细胞凋亡 消化 SH-SY5Y 细胞,制单细胞悬液,细胞计数调整浓度至 5×10⁵/mL;将细胞接种至两个 24 孔培养板,每孔加入 500 μL。将培养板放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 1 d。各组细胞更换各自含糖液继续培养 1 d。将其中一板吸净培养基,用含 1 mmol/L 布比卡因培养基培养 6 h。各组细胞用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,收集细胞至 1.5 mL 离心管并用 500 μL Binding buffer 重悬细胞。在每管细胞加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,避光室温下孵育 5 min 后用 FCM 检测。

1.2.4 Western blot 检测 GRP78 表达水平 消化 SH-SY5Y 细胞,制单细胞悬液,细胞计数调整浓度至 5×10⁵/mL;细胞接种至两个 6 孔培养板,每孔加入 1 000 μL。其中一块培养板放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 1 d。各组细胞更换各自含糖液继续培养 2 d。将另一块培养板放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 1 d。各组细胞更换各自含糖液继续培养 1 d。吸净培养基,每孔加入 1 mmol/L 布比卡因,放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 6 h。然后进行蛋白样品制备、电泳、转膜、免疫反应、ECL 反应及曝光、显影、凝胶图像分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,ROS 水平和细胞凋亡率采用两因素析因设计资料方差分析,组间比较采用 LSD 法(方差齐)或 Dunnett's T3 法(方差不齐)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 布比卡因作用前、后细胞内 ROS 产量比较 当葡萄糖浓度分别为 5.56、6.10、7.00、7.80、11.10、13.30 mmol/L 时,布比卡因作用前、后细胞内 ROS 产量依次为 308±12、454±11、526±18、603±45、905±18、653±287 和 361±12、478±33、583±68、733±34、984±20、1 571±162。布比卡因作用前、后 5.56、7.80、11.10、13.30 mmol/L 组内比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。6.10、7.00 mmol/L 组内比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明布比卡因作用前、后随着葡萄糖浓度升高,ROS 产量亦随之增加。

2.2 布比卡因作用前、后细胞凋亡比较 当葡萄糖浓度分别为 5.56、6.10、7.00、7.80、11.10、13.30 mmol/L 时,布比卡因

作用前、后细胞凋亡率依次为 0.014±0.001、0.017±0.001、0.026±0.001、0.029±0.001、0.047±0.001、0.050±0.002 和 0.018±0.001、0.028±0.001、0.033±0.002、0.043±0.002、0.063±0.001、0.079±0.002。布比卡因作用前、后组内比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。表明布比卡因作用前、后随着葡萄糖浓度升高,细胞凋亡亦随之增加。

2.3 布比卡因作用前、后细胞 GRP78 表达量 当葡萄糖浓度分别为 5.56、6.10、7.00、7.80、11.10、13.30 mmol/L 时,布比卡因作用前、后细胞 GRP78 表达量依次为 1.20±0.15、0.88±0.04、0.97±0.05、0.83±0.04、0.94±0.05、0.26±0.06 和 1.02±0.12、0.97±0.06、0.49±0.04、0.46±0.06、0.22±0.03、0.15±0.07。5.56 mmol/L、6.10 mmol/L、13.30 mmol/L 组内比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。7.00、7.80 mmol/L、11.10 mmol/L 组内比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明低糖环境可诱导细胞 GRP78 表达,随着葡萄糖浓度进一步升高,GRP78 表达量剧降;布比卡因作用下,低糖环境抑制细胞 GRP78 表达,正常血糖范围内,细胞产生稳定量的 GRP78 较低糖环境下低。随着葡萄糖浓度进一步升高,GRP78 产量剧降。

3 讨论

高糖环境下局部麻醉药神经毒性机制的研究报道甚少。妊娠期糖尿病为一类特有糖尿病,不同于原发性 I 型和 II 型糖尿病。但两者特点之一为 ERS 与糖尿病代谢紊乱有关^[2]。

布比卡因作用前、后随着葡萄糖浓度升高,ROS 产量随之增加,细胞凋亡亦随之增加。说明 SH-SY5Y 细胞在代谢刺激下内质网功能发生变化。内质网具有较强的内稳态体系,可仍然有很多因素导致内质网功能内稳态失衡,形成 ERS。能量和营养过剩激发 ERS^[3-4],细胞器代谢负荷过重和线粒体功能障碍产生 ROS。高糖环境激活细胞半胱氨酸酶活性,导致乳酸脱氢酶泄漏,细胞毒性增加^[5]。布比卡因使细胞 ERS 明显增强,ROS 产量增多^[6],细胞毒性增加,细胞凋亡增多。

ERS 反应是一种细胞水平上的保护性手段。GRP78 表达增加提高细胞抵御应激的能力。GRP78 在正常细胞内呈低水平表达^[7],保护细胞免受应激因素所导致的凋亡^[8]。低糖环境诱导细胞 GRP78 表达,随着葡萄糖浓度进一步升高至正常血糖浓度范围,GRP78 产量降低;葡萄糖浓度继续增高,细胞 GRP78 表达再次升高。但随着糖浓度极度增加,ERS 增强致氧化,代谢、转化负荷过重,ROS 在细胞内毒性积累,细胞发生凋亡,表现为 GRP78 表达降低。细胞 ERS 增强和(或)自身修复机制启动 GRP78 合成以维持细胞生存,此时表现为 GRP78 表达呈一定程度增加。ERS 后期细胞凋亡增多,GRP78 产量急剧下降。本实验还说明正常血糖浓度是神经细胞生长和局部麻醉药神经毒性损伤恢复所需最适宜环境^[9-15]。

虽然本细胞模型尽量模仿临床实际情况,但还有许多局限性。人体神经细胞所处体内环境复杂,而在实验中仅考虑高糖环境这一独立因素对 SH-SY5Y 细胞的影响。下一步研究方向是在整体动物实验和临床受试人群水平研究高血糖环境对局部麻醉药神经毒性的影响。随着对 ERS 与局部麻醉药神经毒性关系的深入研究,将能更好地理解局部麻醉药神经毒性分子机制,为治疗局部麻醉药神经毒性提供新的治疗靶点和寻找新的治疗途径。

参考文献

- [1] Arakawa M. Does pregnancy increase the efficacy of lumbar epidural anesthesia? [J]. Int J Obstet(下转第 2453 页)

- cle: A critical landmark in axillary dissection[J]. ANZ J Surg, 2006, 76(7): 652-654.
- [2] Torresan RZ, Cabello C, Conde DM, et al. Impact of the preservation of the intercostobrachial nerve in axillary lymphadenectomy due to breast cancer[J]. Breast J, 2003, 9(5): 389-392.
- [3] Li JY, Jia S, Zhang WH, et al. A new technique that complements sentinel lymph node biopsy: lymph node dissection under the intercostobrachial nerves in Early-Stage breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2013, 13(3): 212-218.
- [4] Chengyu L, Yongqiao Z, Hua L, et al. A standardized surgical technique for mastoscopic axillary lymph node dissection[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 94(1): S42.
- [5] Ramanadham S, Kalthur SG, Pai SR. Unilateral axillary arch and variations in the axillary vein and intercostal nerves: a case report [J]. Malays J Med Sci, 2011, 18(1): 68-71.
- [6] Barry M, Kell MR. Breast cancer: can axillary lymph node dissection be avoided? [J]. EJSO, 2012, 38(1): 6-7.
- [7] Luo CY, Guo WB, Yang J, et al. Comparison of mastoscopic and conventional axillary lymph node dissection in breast cancer: long-term results from a randomized, multi-center trial[J]. Mayo Clin Proc, 2012, 87(12): 1153-1161.
- [8] Brar P, Jain S, Singh I. Complications of axillary lymph node dissection in treatment of early breast cancer: a comparison of MRM and BCS [J]. Indian J Surg Oncol, 2011, 2(2): 126-132.
- [9] Han JW, Seo YJ, Choi JE, et al. The efficacy of arm node preserving surgery using axillary reverse mapping for preventing lymphedema in patients with breast cancer[J]. J Breast Cancer, 2012, 15(1): 91-97.
- [10] Chowdhry S, Elston JB, Lefkowitz T, et al. Avoiding the medial brachial cutaneous nerve in brachioplasty: an anatomical study [J]. Eplasty, 2010, 6(29): 134-139.
- [11] Li J, Zhang Y, Zhang W, et al. Intercostobrachial nerves as a novel anatomic landmark for dividing the axillary space in lymph node dissection [J]. ISRN Oncol, 2013, 2013(6): 1-7.
- [12] Hwang K, Huan F, Hwang SW, et al. The course of the intercostobrachial nerve in the axillary region and as it is related to transaxillary breast augmentation [J]. Ann Plast Surg, 2014, 72(3): 337-339.
- [13] 印国兵, 吴诚义. 肋间臂神经的解剖及其临床意义[J]. 中国临床解剖学杂志, 2004, 22(2): 168-170.
- [14] Loukas M, Louis J, Wartmann CT. T2 contributions to the brachial plexus [J]. Neurosurgery, 2007, 60(2 Suppl 1): 13-18.
- [15] Loukas M, Hullett J, Louis RG, et al. The gross anatomy of the extrathoracic course of the intercostobrachial nerve [J]. Clin Anat, 2006, 19(2): 106-111.

(收稿日期: 2014-12-18 修回日期: 2015-01-16)

(上接第 2450 页)

- Anesth, 2004, 13(2): 86-90.
- [2] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. Cell, 2010, 140(6): 900-917.
- [3] Zhang C, Schulze MB, Solomon CG, et al. A prospective study of dietary patterns, meat intake and the risk of gestational diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 2006, 49(11): 2604-2613.
- [4] 应豪, 王德芬. 膳食脂肪对妊娠期糖尿病孕妇发病的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(11): 729-731.
- [5] Nazeer AA, Saito S, Sayed S, et al. Normal glucose enhances neuronal regeneration after lidocaine-induced injury[J]. Br J Anaesth, 2010, 104(4): 482-486.
- [6] Park CJ, Park SA, Yoon TG, et al. Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line[J]. J Dent Res, 2005, 84(9): 852-857.
- [7] Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands[J]. Cancer Cell, 2004, 6(3): 275-284.
- [8] Miyake H, Hara I, Arakawa S, et al. Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by Calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells[J]. Cell Biochem, 2000, 77(3): 396-408.
- [9] Nazeer AA, Saito S, Sayed S, et al. Normal glucose enhances neuronal regeneration after lidocaine-induced injury[J]. Br J Anaesth, 2010, 104(4): 482-486.
- [10] Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, et al. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes [J]. Neurobiol Dis, 1999, 6(5): 347-363.
- [11] Russel JW, Golovoy D, Vincent AM, et al. High glucose induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons[J]. FASEB J, 2002, 66(5): 1738-1748.
- [12] Nickander KK, Schmelzer JD, Rohwer DA, et al. Effect of tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve[J]. Neurol Sci, 1994, 126(1): 6-14.
- [13] Bamberg JR. Introduction to cytoskeletal dynamics and pathfinding of neuronal growth cones[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2003, 51(4): 407-409.
- [14] Radwan IA, Saito S, Goto F. Growth cone collapsing effect of lidocaine on DRG neurons is partially reversed by several neurotrophic factors [J]. Anesthesiology, 2002, 97(3): 630-635.
- [15] Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction[J]. Diabetes, 2000, 49(11): 1932-1938.

(收稿日期: 2014-10-28 修回日期: 2014-12-10)