

## 右美托咪定抑制丙泊酚诱导原代培养皮层神经元凋亡\*

李建立<sup>1</sup>,尹德云<sup>2</sup>,王蕴欣<sup>1</sup>,吴红海<sup>3</sup>,侯艳宁<sup>3</sup>

(1. 河北省人民医院麻醉科,石家庄 050051;2. 河北省人民医院心内科,石家庄 050051;

3. 白求恩国际和平医院药剂科,石家庄 050082)

**[摘要]** **目的** 探讨右美托咪定抑制丙泊酚诱导原代培养皮层神经元凋亡的机制。**方法** 体外原代培养 7 d 的大鼠皮层神经元,给予 500  $\mu\text{mol/L}$  丙泊酚和(或)不同浓度右美托咪定处理 12 h 后,分为丙泊酚组、右美托咪定+丙泊酚组,对照组给予同溶剂的 20% 脂肪乳,用四甲基唑蓝(MTT)法检测各组神经元存活率的变化,Hoechst33258 核染色法检测神经元凋亡,蛋白质印迹法(Western blotting)测定神经元磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(pCREB)和细胞色素 C(Cyt-C)蛋白水平。**结果** 与对照组比较,丙泊酚组神经元存活率明显下降,神经元凋亡率明显增加,pCREB 蛋白水平明显降低,Cyt-C 蛋白水平明显增加,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。与丙泊酚组比较,右美托咪定+丙泊酚组神经元存活率明显增加,神经元凋亡率明显下降,pCREB 蛋白水平明显增加,Cyt-C 蛋白水平明显下降,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。**结论** 右美托咪定可对抗丙泊酚引起的原代培养皮层神经元凋亡,其机制可能与增加 pCREB 蛋白水平,降低 Cyt-C 蛋白水平有关。

**[关键词]** 丙泊酚;右美托咪定;原代培养皮层神经元;凋亡;磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白;细胞色素 C

**[中图分类号]** R614

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4911-03

## Dexmedetomidine inhibits propofol-induced apoptosis in primary cultured cortical neurons\*

Li Jianli<sup>1</sup>, Yin Deyun<sup>2</sup>, Wang Yunxin<sup>1</sup>, Wu Honghai<sup>3</sup>, Hou Yanning<sup>3</sup>

(1. Department of Anesthesiology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China;

2. Department of Cardiology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China;

3. Department of Pharmacy, Bethune International Peace Hospital of Chinese PLA, Shijiazhuang, Hebei 050082, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the mechanisms of the protective effects of dexmedetomidine against the propofol-induced neuroapoptosis in primary cultured cortical neurons. **Methods** The neurons were cultured for 7 days and treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  propofol and(or) different concentrations of dexmedetomidine, then were divided into the propofol treatment group, propofol+dexmedetomidine treatment group. The neurons in the control group were treated with 20% fat emulsion dissolved in the same solvent. 12 hours after different treatments, neuron viability was measured by using MTT assay, neuroapoptosis was detected by using Hoechst33258 staining, and the levels of pCREB and Cyt-C protein were detected by using Western blotting. **Results** Compared with the control group, propofol inhibited neuron viability greatly, the neuroapoptosis increased greatly, the level of pCREB decreased greatly and the level of Cyt-C increased greatly, there were statistically significant differences( $P<0.01$ ). Compared with propofol treatment group, dexmedetomidine increased neuron viability greatly, the neuroapoptosis decreased greatly, the level of pCREB increased greatly and the level of Cyt-C decreased greatly, there were statistically significant differences. **Conclusion** Dexmedetomidine exerts the neuroprotective effects against propofol-induced neuroapoptosis, which may be associated with the increase of pCREB level and the decrease of Cyt-C level.

**[Key words]** propofol; dexmedetomidine; primary cultured cortical neurons; apoptosis; phosphorylated cAMP response-element binding protein; cytochrome C

丙泊酚通过激动  $\gamma$  氨基丁酸 A 型受体(gamma amino acid type A receptor, GABA<sub>A</sub>)和抑制 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)发挥麻醉作用,被广泛用于麻醉诱导和维持。药典显示 3 岁以下患儿慎用丙泊酚,但在临床工作中丙泊酚被广泛用于婴幼儿麻醉。丙泊酚是否对发育期大脑产生神经损伤目前观点不一。最近研究表明,丙泊酚可引起发育期动物大脑广泛脑区神经细胞和原代培养神经元凋亡<sup>[1-4]</sup>。因此,寻找药物抑制丙泊酚发育期神经毒性已成为婴幼儿麻醉的重要研究内容。右美托咪定是高选择性  $\alpha_2$  肾上腺素受体激动药,具有镇静、镇痛和拮抗交感神经活性的作用,可对抗丙泊酚引起的原代培养神经元凋亡和发育期大鼠大脑神经损伤,但具体机制还不清楚<sup>[5-6]</sup>。本文利用原代培养

皮层神经元研究右美托咪定对抗丙泊酚诱导原代培养皮层神经元凋亡的机制。

## 1 材料与方

**1.1 药物与试剂** 丙泊酚(Diprivan,意大利 AstraZeneca 公司,批号:KW814),右美托咪定(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 14102132);20% 脂肪乳购自广州百特公司,DMEM 培养液、胎牛血清、Neurobasal 培养液、B27 促生长剂购自美国 Gibco 公司,LY294002、二甲基亚砜(DMSO)、唑啉蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司,Hoechst33258 荧光染料和胰蛋白酶购自北京索来宝公司,磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(phosphorylated cAMP response-element binding protein, pCREB)和细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-C)抗体购自美国 Cell Signal Tech-

\* 基金项目:河北省卫生计生厅指令性课题资助项目(ZL20140095);2015 年政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目(361003-6)。

作者简介:李建立(1976—),副教授,博士,主要从事麻醉药理学研究。

nology 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 皮层神经元原代培养** 按文献[7]进行原代皮层神经元培养。体外培养 7 d 的神经元用于实验。

**1.2.2 实验分组** 观察右美托咪定对神经元的保护作用时,分为对照组(给予同溶剂的 20% 脂肪乳)、丙泊酚组(丙泊酚终浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$ )、右美托咪定+丙泊酚组(右美托咪定终浓度分别为 0.001、0.010、0.100、1.000  $\mu\text{mol/L}$ , 丙泊酚终浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$ )。检测各种处理对神经元凋亡的影响时,分为对照组(给予同溶剂的 20% 脂肪乳)、丙泊酚组(终浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$ )、右美托咪定+丙泊酚组(右美托咪定终浓度为 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 丙泊酚终浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$ )。

**1.2.3 四甲基嘧啶蓝(MTT)法检测神经元存活率** 将细胞接种于 96 孔板,体外培养至第 7 天分别给予不同的药物处理 12 h 后,按文献[7]应用 MTT 法检测神经元存活率。

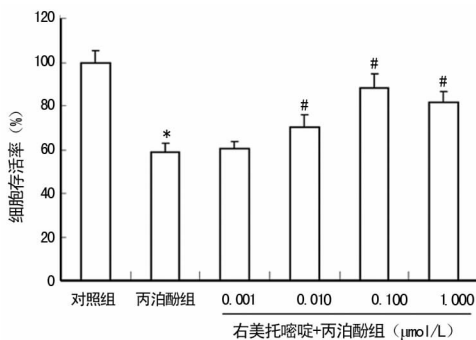
**1.2.4 Hoechst33258 核染色法检测神经元凋亡** 将神经元接种于 6 孔培养板中,按上述方法培养,分别给予不同药物处理后,按文献[7]应用 Hoechst33258 核染色法检测神经元凋亡。

**1.2.5 蛋白质印迹法(Western blotting)测定 pCREB 和 Cyt-C 蛋白水平** 细胞经不同药物处理后,收集细胞,裂解细胞提取总蛋白,BCA 法检测样品蛋白水平。取待测蛋白质 50  $\mu\text{g}$  加上样缓冲液煮沸变性,于 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中 100 V 电泳 1.5 h,转膜 1 h,加入 pCREB 和 Cyt-C 抗体(1:2 000),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,常规洗涤,加羊抗鼠二抗(1:5 000)37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min,洗涤,电化学法发光、显影、扫描,用凝胶图像处理系统分析目标条带与内参条带吸光度的比值。实验重复 3 次,设  $\beta$ -actin 蛋白为内参。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和 SNK 检验进行分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同处理对原代培养皮层神经元存活率的影响** 与对照组比较,丙泊酚组神经元存活率明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与丙泊酚组比较,右美托咪定可浓度依赖性提高神经元存活率,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1。



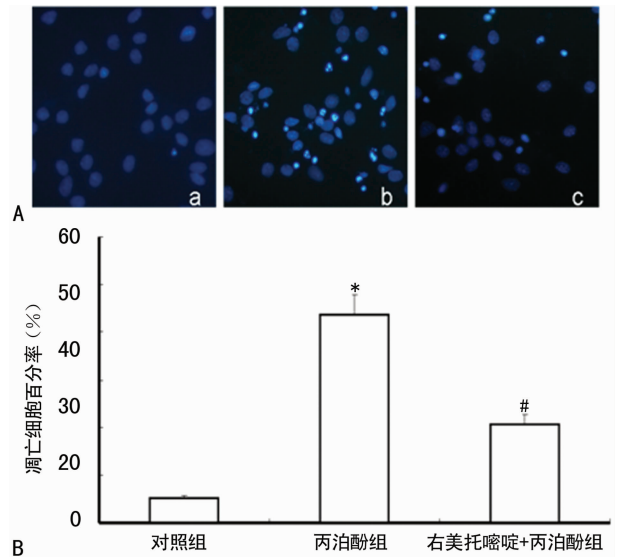
\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.01$ , 与丙泊酚组比较。

图 1 不同处理对神经元存活率的影响

**2.2 不同处理对原代培养皮层神经元凋亡的影响** 与对照组比较,丙泊酚组神经元凋亡率明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与丙泊酚组比较,右美托咪定+丙泊酚组皮层神经元凋亡率明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 2。

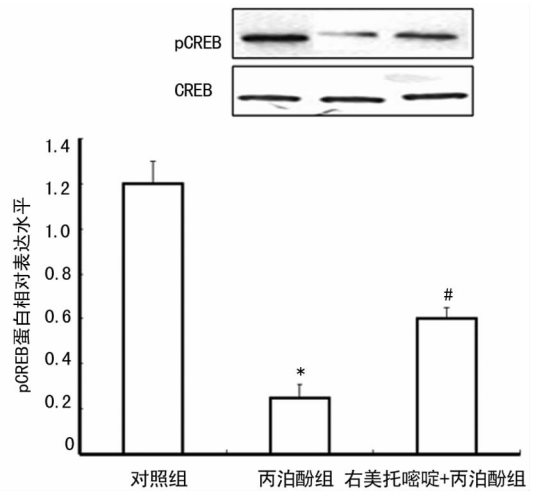
**2.3 不同处理对原代培养皮层神经元 pCREB 蛋白水平的影响** 与对照组比较,丙泊酚组 pCREB 蛋白水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与丙泊酚组比较,右美托咪定+丙泊酚组 pCREB 蛋白水平明显增加,差异有统计学意义( $P <$

0.01),见图 3。



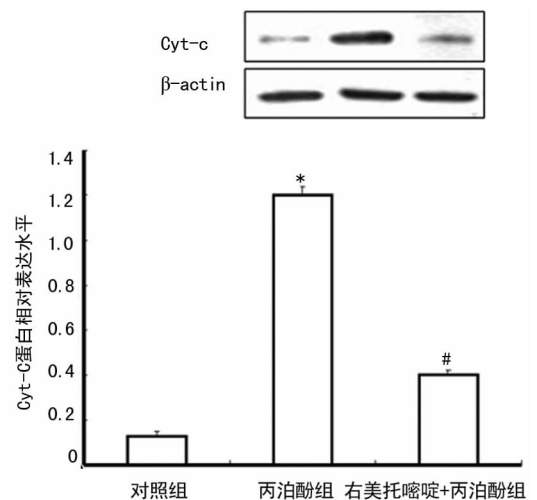
A: Hoechst33258 核染色法( $\times 200$ ); a: 对照组; b: 丙泊酚组; c: 右美托咪定+丙泊酚组; \*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.01$ , 与丙泊酚组比较。

图 2 不同处理对神经元凋亡的影响



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.01$ , 与丙泊酚组比较。

图 3 不同处理对神经元 pCREB 蛋白水平的影响



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.01$ , 与丙泊酚组比较。

图 4 不同处理对神经元 Cyt-C 蛋白水平的影响

**2.4 不同处理对原代培养皮层神经元 Cyt-C 蛋白水平的影响** 与对照组比较,丙泊酚组 Cyt-C 蛋白水平明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与丙泊酚组比较,右美托咪定+丙泊酚组 Cyt-C 蛋白水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 4。

### 3 讨论

全世界每年有众多患儿因各种原因接受全身麻醉。近年来多项研究报道丙泊酚具有发育期神经毒性,可对发育期动物大脑和原代培养神经元产生损伤<sup>[1-4]</sup>,因此,丙泊酚的发育期神经毒性引起了学者的广泛关注,同时寻找安全有效防治丙泊酚发育期神经毒性的药物具有十分重要的临床意义。

右美托咪定是临床上常用的高选择性的 $\alpha_2$ 肾上腺素受体激动药,具有抑制交感神经,镇静镇痛和减少麻醉药用量等作用,作为麻醉辅助药物被广泛用于临床麻醉中。目前研究发现,右美托咪定可对多种神经损伤模型产生保护作用,如对抗缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>,高氧诱导的发育期大脑损伤<sup>[9]</sup>。另有研究发现,右美托咪定可抑制丙泊酚引起的原代培养海马神经元存活率的下降,其机制尚不清楚<sup>[6]</sup>。另有研究表明,右美托咪定不会对发育期大脑产生神经损伤<sup>[10]</sup>。本文利用原代培养皮层神经元研究右美托咪定对抗丙泊酚引起原代培养皮层神经元损伤的机制。MTT 结果显示,与对照组比较,丙泊酚组神经元存活率明显降低,右美托咪定可浓度依赖性地提高神经元的存活率。Hoechst33258 核染色结果显示,与对照组比较,丙泊酚组神经元凋亡率明显增加,与丙泊酚组比较,右美托咪定+丙泊酚组神经元凋亡率明显降低。

CREB 为神经保护的中枢调节因子,参与细胞内多种信号通路的传导,其磷酸化在调控转录起始过程中发挥着关键作用,另外磷酸化 CREB ser-133 位点可介导神经元存活及突触的形成,通过调控大量促神经元存活基因如 Bcl-2 和脑源性神经营养因子(BDNF)的表达,进而发挥神经保护作用<sup>[11]</sup>。研究发现,丙泊酚通过抑制 CREB 的磷酸化水平引起神经细胞损伤<sup>[12-13]</sup>,右美托咪定可通过提高原代培养海马神经元 pCREB 蛋白水平,进而抑制海马神经元凋亡<sup>[14]</sup>。本文 Western blotting 结果显示,与对照组比较,丙泊酚组 pCREB 蛋白水平明显降低,与丙泊酚组比较,右美托咪定+丙泊酚组 pCREB 蛋白水平明显增加,提示丙泊酚通过降低皮层神经元 pCREB 蛋白水平引起皮层神经元凋亡,而右美托咪定可通过提高 pCREB 蛋白水平对抗丙泊酚诱导的原代培养皮层神经元凋亡。Cyt-C 在线粒体凋亡信号转导途径中发挥着重要的作用,Cyt-C 释放入细胞质是细胞凋亡发生的关键步骤。Cyt-C 是线粒体呼吸链上的重要组成成分,生理状态下 Cyt-C 存在于线粒体内,当刺激因子作用于细胞后线粒体通过多种离子转运机制,导致内膜两侧离子浓度差的变化,引起线粒体膜电位的下降,使线粒体膜电位通透性增加,Cyt-C 释放入细胞质,进而激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3),引起细胞凋亡。本文 Western blotting 结果显示,与对照组比较,丙泊酚组 Cyt-C 蛋白水平明显增加,与丙泊酚组比较,右美托咪定+丙泊酚组 Cyt-C 蛋白水平明显下降,提示丙泊酚通过增加皮层神经元 Cyt-C 蛋白水平引起皮层神经元凋亡,而右美托咪定可通过降低 Cyt-C 蛋白水平对抗丙泊酚诱导的原代培养皮层神经元凋亡。

综上所述,右美托咪定通过抑制丙泊酚引起的神经元 pCREB 蛋白水平的下降,降低 Cyt-C 蛋白水平,抑制丙泊酚诱导的原代培养皮层神经元凋亡。本研究为围术期应用右美托咪定预防丙泊酚引起的发育期大脑损伤提供了初步的实验依

据和理论依据。

### 参考文献

- [1] Huang J, Jing S, Chen X, et al. Propofol administration during early postnatal life suppresses hippocampal neurogenesis[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 1031-1044.
- [2] Karen T, Schlager GW, Bendix I, et al. Effect of propofol in the immature rat brain on short-and long-term neurodevelopmental outcome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64480.
- [3] Zhong Y, Liang Y, Chen J, et al. Propofol inhibits proliferation and induces neuroapoptosis of hippocampal neurons in vitro via downregulation of NF- $\kappa$ B p65 and Bcl-2 and upregulation of caspase-3[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8): 720-729.
- [4] Berns M, Seeberg L, Schmidt M, et al. High-dose propofol triggers short-term neuroprotection and long-term neurodegeneration in primary neuronal cultures from rat embryos[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(3): 680-688.
- [5] Li J, Xiong M, Nadavaluru PR, et al. Dexmedetomidine attenuates neurotoxicity induced by prenatal propofol exposure[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2016, 28(1): 51-64.
- [6] 扈俊华, 梁羽冰, 覃怡, 等. 右美托咪定预处理对丙泊酚孵育的大鼠海马神经元细胞活力的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(5): 488-490.
- [7] Li J, Wu H, Xue G, et al. 17 $\beta$ -oestradiol protects primary-cultured rat cortical neurons from ketamine-induced apoptosis by activating PI3K/Akt/Bcl-2 signalling[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 113(6): 411-418.
- [8] 张晓青, 贾建丽, 冯明静, 等. 右美托咪定减轻大鼠全脑缺血再灌注损伤[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(1): 117-118.
- [9] Sifringer M, von Haefen C, Krain M, et al. Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015(2015): 530371.
- [10] Koo E, Oshodi T, Meschter C, et al. Neurotoxic effects of dexmedetomidine in fetal cynomolgus monkey brain[J]. *J Toxicol Sci*, 2014, 39(2): 251-262.
- [11] Fan M, Jin W, Zhao H, et al. Lithium chloride administration prevents spatial learning and memory impairment in repeated cerebral ischemia-reperfusion mice by depressing apoptosis and increasing BDNF expression in hippocampus[J]. *Behav Brain Res*, 2015(291): 399-406.
- [12] 张英, 吴新海, 郑利民. 丙泊酚对大鼠海马 cAMP 效应元件结合蛋白磷酸化和 cAMP 效应元件结合蛋白 mRNA 表达水平的影响[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2011, 32(3): 303-307.
- [13] 梁羽冰, 利莉, 陈静, 等. 丙泊酚或依托咪酯对大鼠海马胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J]. *广东医学*, 2012, 33(3): 303-305.
- [14] 韦祎, 扈俊华, 梁羽冰, 等. 右美托咪啉对胎鼠离体海马神经元 CREB 磷酸化表达的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(11): 1309-1311.