

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.33.006

丙泊酚对氧糖剥夺导致 PC12 细胞损伤的保护机制*

祁爱花¹,王爱忠¹,王 莉²

(1.上海健康医学院附属第六人民医院东院麻醉科 201306;

2.上海交通大学附属第六人民医院麻醉科 200233)

[摘要] **目的** 研究丙泊酚对氧糖剥夺(OGD)导致神经元样鼠嗜铬细胞瘤(PC12)细胞损伤的影响及机制。**方法** 用神经生长因子(7S-NGF)将 PC12 细胞分化为神经元样 PC12 细胞,于 37℃、5% CO₂+95% N₂ 中孵育 1、6、12、24 和 48 h 后,用 MTT 法获得细胞损伤最明显的时间;用 1、5、10 μmol/L 的丙泊酚分别处理 OGD 损伤的细胞,通过 MTT 法得出对细胞作用最显著的浓度。细胞分为 3 组:正常对照组、OGD 组和 OGD+丙泊酚组,用免疫细胞化学染色和 Western blot 评估丙泊酚的作用及机制。**结果** PC12 细胞 OGD 损伤 12 h 后,观察到约 70% 的细胞损伤;10 μmol/L 丙泊酚处理细胞后,细胞活力增加最为显著($P<0.01$);OGD+丙泊酚组磷酸化应激活化蛋白激酶(SAPK)/Jun 氨基末端激酶(JNK)和 c-Jun 的表达明显低于 OGD 组($P<0.05$)。**结论** 丙泊酚通过 SAPK/JNK-c-Jun 信号通路保护 OGD 损伤的 PC12 细胞。

[关键词] PC12 细胞;丙泊酚;应激活化蛋白激酶/Jun 氨基末端激酶;氧糖剥夺

[中图分类号] R961.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)33-4223-03

Protective effects mechanism of propofol on OGD caused neuronal PC12 cells injury*

QI Aihua¹,WANG Aizhong,WANG Li²

(1. Department of Anesthesiology, Shanghai Sixth People's Hospital East Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201306, China; 2. Department of Anesthesiology, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of propofol on oxygen-glucose deprivation (OGD) caused rat pheochromocytoma cells (PC12) injury. **Methods** PC12 cells were differentiated into neuron-like PC12 cells by nerve growth factor (7S-NGF) and then incubated in 5% CO₂+95% N₂ for 1, 6, 12, 24 and 48 h. MTT method was used to detect the most obvious time of cell injury. OGD-injured PC12 cells were treated with 1 μmol/L, 5 μmol/L and 10 μmol/L propofol respectively, and the propofol concentration which had most significant effect on cells was obtained by using the MTT method. The cells were randomly divided into three groups: normal control group, OGD group and OGD+propofol group. The effect and mechanism of propofol were evaluated by immunocytochemical staining and Western blot. **Results** After PC12 cells OGD injury for 12 h, the injury of about 70% cells was observed; after 10 μmol/L propofol treating the cells, the cellular viability increase was most significantly ($P<0.01$). The expression of phosphorylated SAPK/JNK and c-Jun in the OGD+ propofol group was significantly lower than that in the OGD group ($P<0.05$). **Conclusion** Propofol protects OGD injured PC12 cell through SAPK/ JNK-c-Jun signal pathway.

[Key words] PC12 cells; propofol; SAPK/JNK; oxygen glucose deprivation

大脑是体内对缺氧最敏感的器官之一,围术期缺氧缺血可能导致神经损伤和功能丧失。应激活化蛋白激酶(SAPK)/Jun 氨基末端激酶(JNK)被认为是一种应激活化蛋白激酶,可以活化 caspase 蛋白酶级联和激活 c-Jun 磷酸化,并可作为缺氧缺血性脑损伤的早期标志物^[1]。因此,SAPK/JNK 信号通路是神经药物保护氧糖剥夺(OGD)损伤细胞的重要靶点。某些药物(如褪黑素、五味子素 A 和小檗碱)通过 SAPK/JNK 信号通路保护 OGD 损伤的神经细

胞^[2-4];然而丙泊酚是否可以通过 SAPK/JNK 信号通路降低 OGD 导致的细胞凋亡,迄今仍不明确。本文用丙泊酚处理 OGD 损伤的神经元样鼠嗜铬细胞瘤(PC12)细胞,通过观察细胞活力和蛋白表达,探讨丙泊酚对神经元样 PC12 细胞的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 PC12 细胞购自中国科学院上海细胞库。将细胞培养在含有 5% 胎牛血清(Gibco/Life Technologies Ltd., 苏格兰)和 10% 马血清(Gibco/

* 基金项目:上海健康医学院种子基金项目(SFP-18-22-14-018)。

作者简介:祁爱花(1984—),主治医师,硕士,主要从事麻醉药物的作用

Life Technologies Ltd., 苏格兰)的 RPMI-1640 培养基(Gibco/Life Technologies Ltd., 苏格兰)中,并将其放在 37 °C 恒温、加湿的培养箱中。神经元样 PC12 细胞 OGD 模型:将培养物转移到无葡萄糖的 RPMI 1640 培养基中,并置于具有流入和流出阀门的无氧培养箱(S. E. Barbueros Metalicos S. A, 西班牙)中,然后将箱内注入 0.5% O₂、5% CO₂ 和 95% N₂ 的混合气体长达 48 h。在放入无氧培养箱前 1 min,用 3 种浓度丙泊酚(1、5、10 μmol/L)和 10% 脂肪乳剂处理细胞。

1.2 细胞活力测定 将细胞接种在 96 孔板中,并通过四甲基偶氮唑蓝(MTT)测定细胞活力。细胞在暴露于 OGD 后 1、6、12、24、48 h 后,在常规培养基中于 37 °C 下与 MTT(100 μg/mL)一起温育。4 h 后,洗涤细胞,然后加入 100 μL 二甲亚砜(DMSO)溶解。使用酶联免疫吸附测定仪(Life Science)在 570 nm 监测产物形成。

1.3 cleaved-caspase-3 免疫细胞化学染色 处理后的细胞在室温下用 4% 多聚甲醛(Sigma, 美国)固定 20 min,并加入 0.1% Triton X-100 透化 15 min。然后将细胞与 cleaved-caspase-3 抗体(1:500, Cell Signaling, Danvers, MA)一起孵育 1 h。最后用 BX-51 荧光显微镜(Olympus Corporation, 日本)在 5 个随机选择的连续区域(5 个区域/组)中计数的阳性细胞数目。

1.4 Western blot 细胞处理后,4 °C 磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤并裂解。将总蛋白提取物离心,收集上清液。使用 Bradford 蛋白测定法测定蛋白质浓度。样品在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中分离,并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。在 5% 的无脂牛奶中室温下封闭 1 h;在 4 °C 下用 Bcl-2、cleaved-caspase-3、磷酸化 SAPK/JNK 和 c-Jun 的特异性抗体孵育过夜;并在室温下与辣根过氧化物酶连接的山羊抗兔免疫球蛋白 G 孵育 1 h。用增强的化学发光(ECL)检测蛋白质。用 Quantity One 密度分析软件(Bio-Rad)定量蛋白质条带。

1.5 统计学处理 使用 Graph Pad Prism 5 软件(Graph Pad, 美国)进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析(ANOVA)分析各组之间的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PC12 细胞形态变化 PC12 细胞在未添加 7S-NGF 的培养液中,生长缓慢,树突短,见图 1A;添加 7S-NGF 的细胞培养液将 PC12 细胞分化为神经元样细胞株,约 95% 的细胞新生树突为细胞体直径 2 倍以上,见图 1B。

2.2 神经元样 PC12 细胞活性变化 神经元样 PC12 细胞 OGD 损伤 12 h 后,观察到约 70% 的细胞损伤,见图 2A;OGD+5 μmol/L 丙泊酚处理 PC12 细胞 12

h 后,细胞活力明显增加($P < 0.05$);OGD+10 μmol/L 丙泊酚处理 PC12 细胞 12 h 后,细胞活力增加最为显著($P < 0.01$),见图 2B。

2.3 神经元样 PC12 细胞凋亡情况 OGD 组凋亡细胞数高于正常对照组($P < 0.01$),OGD+丙泊酚组凋亡细胞数低于 OGD 组($P < 0.01$),见图 3A、B。OGD 组 cleaved-caspase-3 的表达明显高于正常对照组($P < 0.05$);OGD+丙泊酚组 cleaved-caspase-3 的表达明显低于 OGD 组($P < 0.05$),OGD 组 Bcl-2 的表达明显低于正常对照组($P < 0.05$);OGD+丙泊酚组 Bcl-2 的表达明显高于 OGD 组($P < 0.05$),见图 3C、D。

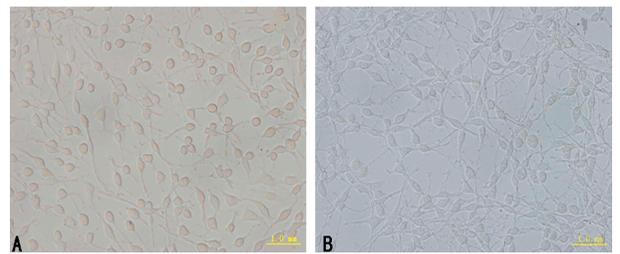


图 1 A:光镜下未添加 7S-NGF 培养的 PC12 细胞;B:光镜下添加 7S-NGF 培养的 PC12 细胞

图 1 PC12 细胞形态的变化(×40)

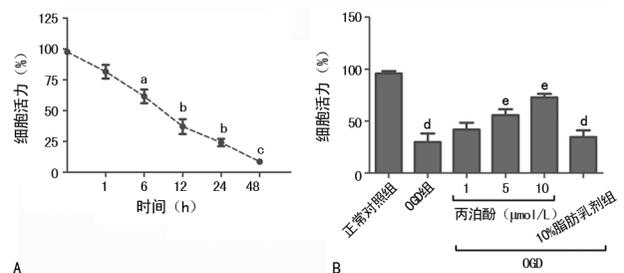


图 2 A:神经元样 PC12 细胞 OGD 损伤;B:药物处理 OGD 损伤的神经元样 PC12 细胞;^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,^c: $P < 0.001$,与 0 h 组比较;^d: $P < 0.01$,^e: $P < 0.05$,与 OGD 组比较

图 2 神经元样 PC12 细胞活性变化

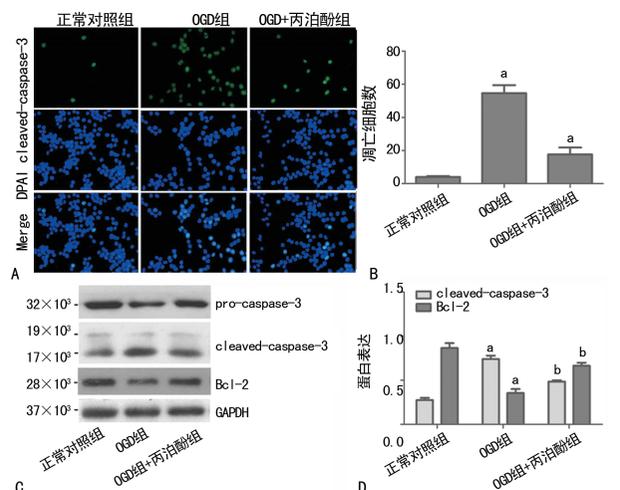
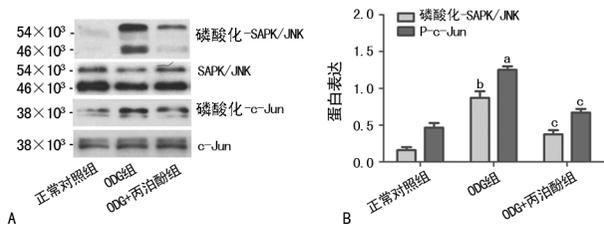


图 3 A:免疫细胞化学染色法显示 cleaved-caspase-3 阳性细胞;B:随机选择的连续区域(5 个区域/组)中计数的阳性细胞数目;C:Western blot 检测;D:cleaved-caspase-3 和 Bcl-2 蛋白组间比较;^a: $P < 0.01$,与正常对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 OGD 组比较

图 3 丙泊酚对 OGD 诱导的神经元 PC12 细胞损伤的影响

2.4 细胞磷酸化 SAPK/JNK 和 c-Jun 的蛋白表达水平 OGD 组磷酸化 SAPK/JNK 和 c-Jun 的表达明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); OGD+丙泊酚组磷酸化 SAPK/JNK 和 c-Jun 的表达明显低于 OGD 组 ($P < 0.05$), 见图 4。



A: Western blot 检测; B: phospho-SAPK/JNK 和 phospho-c-Jun 蛋白组间比较; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 OGD 组比较

图 4 磷酸化 SAPK/JNK 和 c-Jun 的蛋白表达

3 讨 论

本研究的主要发现是丙泊酚通过抑制 SAPK/JNK-c-Jun 信号通路在 OGD 诱导的 PC12 细胞损伤过程中发挥保护作用。

PC12 细胞是研究神经保护药物的有效模型^[5-6], 本文用添加 7S-NGF 的细胞培养液分化 PC12 细胞为神经元样细胞株。95% 的细胞新生树突为细胞体直径 2 倍以上, 即为分裂后期的神经元样细胞株, 用于实验。本研究结果表明, 神经元样 PC12 细胞经 OGD 处理后细胞活力明显降低, 呈时间依赖性; 损伤 12 h 后, 观察到约 70% 的细胞损伤, 所以选择 12 h 用于实验。

本研究发现, 丙泊酚显著降低 OGD 诱导的细胞损伤。SHU 等^[7]也发现高剂量丙泊酚可以减少脑梗死体积和脑水肿, 该结果与本文的实验结果部分一致。但是, 孙茫等^[8]研究发现, 低氧环境下丙泊酚可通过氧化应激损伤增加神经元样 PC12 细胞的凋亡, 但其具体机制仍不清楚。所以, 又进一步观察了凋亡蛋白 caspase-3 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 结果发现, 丙泊酚能明显抑制 cleaved-caspase-3 的水平和增强 Bcl-2 的表达。本研究也对丙泊酚的溶媒脂肪乳剂效应进行了观察, 发现等同于最高浓度 (10 μmol/L) 丙泊酚所含的脂肪乳剂没有明显降低 OGD 导致的细胞损伤, 说明丙泊酚保护神经元样 PC12 细胞的效应是药物本身引起的, 与脂肪乳剂无关。

本实验结果表明, 丙泊酚降低了 OGD 诱导的磷酸化 SAPK/JNK 的表达, 这与 TABAKMAN 等^[9]的研究结果相似, 他们发现药物可以通过 SAPK/JNK 通路阻止 OGD 诱导的神经元损伤。然而, 也有研究报道, 药物保护 OGD 导致神经元的损伤机制可能是阻断 ERK 和 p38 的激活, 但不抑制 JNK 磷酸化^[10]。以上研究显示, 不同的药物对 OGD 诱导的细胞死亡发挥不同的保护机制, 这些保护机制可能与激活不同转录因子有关, 如激活转录因子 2 (ATF2)、Ets 和 c-

Jun 及胱天蛋白酶级联。本研究结果显示, 用 OGD+丙泊酚处理的细胞中, 磷酸化 c-Jun 的表达水平低于 OGD 组。实验证据表明, 丙泊酚保护神经元样 PC12 细胞的作用与 SAPK/JNK-c-Jun 有关。

综上所述, 丙泊酚对 OGD 导致神经元样 PC12 细胞损伤的保护作用与 SAPK/JNK-c-Jun 信号通路有关。这一实验结果为进一步分析丙泊酚对缺血缺氧造成的神经元损伤的保护作用提供了理论依据。

参考文献

- [1] DAMROT J, HELBIG L, ROOS W P, et al. DNA replication arrest in response to genotoxic stress provokes early activation of stress-activated protein kinases (SAPK/JNK)[J]. *J Mol Biol*, 2009, 385(5): 1409-1421.
- [2] SIMÕES PIRES E N, FROZZA R L, HOPPE J B, et al. Berberine was neuroprotective against an in vitro model of brain ischemia: survival and apoptosis pathways involved [J]. *Brain Res*, 2014, 1557: 26-33.
- [3] WANG C P, LI G C, SHI Y W, et al. Neuroprotective effect of schizandrin A on Oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced cell injury in primary culture of rat cortical neurons[J]. *J Physiol Biochem*, 2014, 70(3): 735-747.
- [4] SONG J, KANG S M, LEE W T, et al. The beneficial effect of melatonin in brain endothelial cells against oxygen-glucose deprivation followed by reperfusion-induced injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 639531.
- [5] STERNECK E, KAPLAN D R, JOHNSON P F. Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells[J]. *J Neurochem*, 1996, 67(4): 1365-1374.
- [6] ABU-RAYA S, BLAUGRUND E, TREMBOVLER V, et al. Rasagiline, a monoamine oxidase-B inhibitor, protects NGF-differentiated PC12 cells against oxygen-glucose deprivation[J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58(3): 456-463.
- [7] SHU L, LI T, HAN S, et al. Inhibition of neuron-specific CREB dephosphorylation is involved in propofol and ketamine-induced neuroprotection against cerebral ischemic injuries of mice[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(1): 49-58.
- [8] 孙茫, 沈炼桔, 刘阳, 等. 低氧环境下丙泊酚可增加 PC12 细胞的凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(2): 216-220.
- [9] TABAKMAN R, JIANG H, LEVINE RA, et al. Apoptotic characteristics of cell death and the neuroprotective effect of homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 75(4): 499-507.
- [10] KE S, DIAN-SAN S, XIANG-RUI W. Delta opioid agonist [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin (DADLE) reduced oxygen-glucose deprivation caused neuronal injury through the MAPK pathway[J]. *Brain Res*, 2009, 1292: 100-106.