

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.29.007

丙泊酚抗 N-甲基-D-天冬氨酸毒性作用及其与脑源性神经营养因子表达的关系*

房德芳,江 山,李小雷,石蕊月

(江苏联合职业技术学院连云港中医药分院,江苏连云港 222006)

[摘要] **目的** 研究丙泊酚对 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)毒性损伤的保护作用及其机制。**方法** 采用昆明小鼠制备离体海马脑片,随机分为对照组、损伤组和丙泊酚组(1、5、10 μmol/L),每组 10 张脑片。2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)染色法测定 NMDA 毒性损伤后脑片组织损伤率。细胞外记录技术观察顺向群峰电位(OPS)的变化。免疫组织化学方法观察海马 CA1 区脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白表达的变化。**结果** 与损伤组比较,丙泊酚(5、10 μmol/L)可明显减轻 NMDA 造成的脑片组织损伤($P<0.01$),提高海马脑片 OPS 恢复程度($P<0.01$),明显增强 BDNF 表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 丙泊酚可通过增强 BDNF 的表达,减轻细胞损伤,促进神经元突触传递功能的恢复。

[关键词] 丙泊酚;N-甲基-D-天冬氨酸;毒性损伤;顺向群峰电位;脑源性神经营养因子
[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)29-3752-03

The protective effects of propofol on toxicity induced by N-methyl-D-aspartate and its relationship with brain-derived neurotrophic factor expression*

FANG Defang, JIANG Shan, LI Xiaolei, SHI Ruyue

(Lianyungang Branch of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Union Technical Insititue, Lianyungang, Jiangsu 222006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of propofol on toxic injury induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the relative mechanisms. **Methods** Hippocampal slices were prepared from Kunming mice and randomly divided into the control group, the injury group and the propofol group (1, 5, 10 μmol/L), 10 slices per group. The injury of hippocampal slices was measured by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The changes of orthodromic population spike (OPS) after toxic injury induced by NMDA were observed by extracellular recording technique. The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampal CA1 regions was measured by immunohistochemical assay. **Results** Compared with the injury group, propofol (5, 10 μmol/L) significantly attenuated hippocampal tissue injury induced by NMDA ($P<0.01$), improved the recovery amplitude of OPS ($P<0.01$), and increased the expression of BDNF in hippocampal CA1 regions ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Propofol could antagonize NMDA toxicity and improve the recovery of synaptic transmission neurons, which might be related to the upregulation of BDNF expression.

[Key words] propofol; N-methyl-D-aspartate; toxicity injury; orthodromic population spike; brain-derived neurotrophic factor

丙泊酚是一种静脉麻醉药物,被广泛用于临床麻醉和镇静,并且对心脏、脑等脏器也有一定的保护作用^[1-2],然而对于丙泊酚脑保护的确切作用机制仍不明确。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在中枢神经系统内有着广泛分布,在神经元生长发育中起着重要作用,并可促进神经元损伤后的再生和修复^[3-4]。有研究发现,丙泊酚促进创伤性脑损伤大鼠神经功能和学习记忆认知功能的恢复可能与促进 BDNF 的表达相关^[5]。当中枢神经损伤发生后,可导致兴奋性氨基酸过度释放,刺激 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体过度兴奋从而诱发钙

离子(Ca²⁺)大量内流超载,最终引起神经元死亡^[6-7]。丙泊酚有拮抗 NMDA 受体的作用,但其作用是否与调控 BDNF 的表达有关仍不清楚。本实验采用离体海马脑片损伤模型,观察海马 CA1 区诱发电位和 BDNF 表达的变化,以探讨丙泊酚对于 NMDA 毒性损伤保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 雄性昆明小鼠(徐州医科大学实验动物中心提供),体质量 20~26 g,随机分为对照组、损伤组和丙泊酚组(1、5、10 μmol/L)。

* 基金项目:江苏省青蓝工程基金资助项目(2016)。 作者简介:房德芳(1976—),副教授,硕士,主要从事脑保护机制研究。

1.1.2 仪器与试剂 MEZ-8301 微电极放大器(日本光电)、SEN-3301 刺激器(日本光电)、ZQP-86 振动切片机(上海海天电子仪器公司)、HXD-2000 处理分析软件(北京华翔公司)。丙泊酚购自英国 AstraZeneca 公司,NM-DA 购自美国 Sigma 公司,兔多克隆一抗购自美国 Santa Cruz 公司。人工脑脊液(ACSF)成分及含量(mmol/L): NaCl 124 mmol/L, KCl 3.3 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.24 mmol/L, MgSO₄ 2.4 mmol/L, NaHCO₃ 25.7 mmol/L, CaCl₂ 2.4 mmol/L, 葡萄糖 10.0 mmol/L, pH 7.35~7.45。

1.2 方法

1.2.1 离体海马脑片的制备 小鼠麻醉后,断头取脑,然后将脑组织置于 95% O₂ 与 5% CO₂ 混合气体饱和的 ACSF 中(0~4℃),使用振动切片机切取厚度为 400 μm 的海马脑片(每组 10 张脑片),然后将脑片放置在(32.0±0.5)℃的 95% O₂ 与 5% CO₂ 混合气体饱和 ACSF 中孵育和恢复 2~3 h。实验时将 4~5 张脑片移入全浸式恒温灌流槽内(32.0±0.5)℃,灌流速度为 1.5~2.0 mL/min。

1.2.2 实验程序 NMDA 毒性实验用含 NMDA (0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L)的 ACSF 灌流脑片,20 min 后去除 NMDA,再用经 95% O₂ 与 5% CO₂ 混合气体饱和的 ACSF 灌流,观察时间至去除 NMDA 后 2 h。实验组给药方法:在 NMDA 使用前 15 min,使用中 20 min,去除后 15 min 这段时间内将不同浓度的丙泊酚(1、5、10 μmol/L)加入灌流液中。对照组无药物处理。

1.2.3 顺向群峰电位(OPS)的记录 选取灌流槽内 1 张脑片,将刺激电极放置在小鼠海马脑片 CA3 区的 Schaffer 侧支路径上,记录电极为玻璃微电极(内充 2 mmol/L NaCl 溶液,电阻为 2~10 MΩ),置于 CA1 区锥体细胞层,可记录到诱发电位。OPS 经放大后输入计算机进行数据分析。实验中观察 OPS 波幅的变化,直至去除 NMDA 2 h 后 OPS 的恢复情况。

1.2.4 脑片组织损伤测定 采用 2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)染色法测定。去除 NMDA 2 h 后,灌流槽内的部分脑片用 2% TTC 染色 30 min,漂洗,表面水分用滤纸吸干,脑片称重后,以 1 g : 20 mL 的比例加入抽提液(乙醇 : 二甲亚砜=1 : 1),避光密闭保存 24 h,抽提液按 100 μL 的量分别加入 96 孔板,酶标仪测定各孔在 490 nm 处吸光度值。脑片组织损伤率按以

下公式计算:组织损伤百分率=(1-A 损伤/A 对照)×100%。

1.2.5 免疫组织化学测试 去除 NMDA 2 h 后,灌流槽内部分脑片经 4%多聚甲醛固定 8 h 后,用不同浓度的蔗糖进行梯度脱水,连续海马冠状冰冻 30 μm 切片。采用 SP 法,切片经 3%过氧化氢(H₂O₂)处理消除内源性过氧化物酶的活性,冲洗后加羊血清进行封闭处理,然后滴加兔多克隆 BDNF 一抗(1 : 200 稀释),放置在 4℃冰箱内过夜,冲洗后滴加羊抗兔二抗,37℃下孵育 1 h,冲洗后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白霉素工作液,37℃下孵育 1 h,冲洗后二氨基联苯胺(DAB)显色,然后贴片、脱水、透明和封片。

1.3 观察指标 电生理实验 OPS 恢复幅度:去除 NMDA 2 h 后 OPS 波幅与初始 OPS 波幅的百分比。免疫组织化学结果采用图像分析处理系统进行灰度分析,每张切片在高倍镜下计数海马 CA1 区阳性细胞的染色强度,以背景灰度值减去测量处灰度值后的平均值作为最终灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NMDA 毒性对脑片损伤的影响 在加入 NMDA(0.1 mmol/L)后海马脑片 CA1 区 OPS 振幅增大,并一直维持到去除 NMDA 2 h 后。在加入 NMDA(0.5 mmol/L)后 OPS 逐渐减小,去除 NMDA 2 h 后 OPS 恢复程度降低,海马脑片损伤率增加。在加入 NMDA(1.0、2.0 mmol/L)后 OPS 在 20 min 内消失,去除 NMDA 2 h 后 OPS 恢复程度均明显降低,海马脑片损伤率明显增加,见表 1。

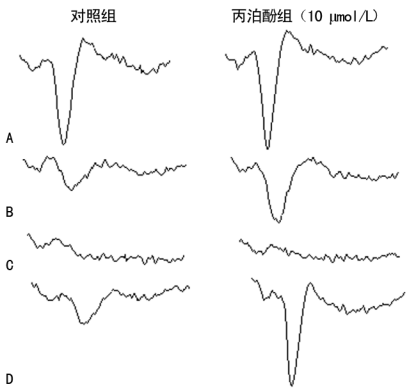
2.2 丙泊酚对 NMDA 毒性损伤后脑片 OPS 的影响 在损伤组去除 NMDA(1 mmol/L)2 h 后海马脑片 CA1 区 OPS 恢复程度较低。丙泊酚(5、10 μmol/L)可明显提高 OPS 恢复程度,与损伤组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2、图 1。

2.3 丙泊酚对 NMDA 毒性损伤后脑片组织损伤的影响 在损伤组去除 NMDA(1 mmol/L)2 h 后海马脑片损伤率较大。丙泊酚(5、10 μmol/L)可使损伤率明显降低,与损伤组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 不同浓度 NMDA 对海马脑片损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	OPS 振幅 (%)				损伤率 (%)
	NMDA 损伤前	NMDA 损伤 4 min	NMDA 损伤 20 min	NMDA 损伤后 2 h	
对照组	100.1±0.7	100.0±1.1	101.0±1.7	100.0±2.4	0
NMDA(0.1 mmol/L)	100.2±1.1	105.6±1.4	118.1±3.5	108.4±14.2	12.4±1.3
NMDA(0.5 mmol/L)	100.5±1.2	37.4±8.6 [#]	9.4±1.3 [#]	84.3±21.7 [*]	23.5±3.7 [#]
NMDA(1.0 mmol/L)	100.3±0.9	5.7±0.9 [#]	0	19.7±8.5 [#]	49.6±4.7 [#]
NMDA(2.0 mmol/L)	100.9±1.2	4.8±0.5 [#]	0	1.8±0.2 [#]	50.8±6.2 [#]

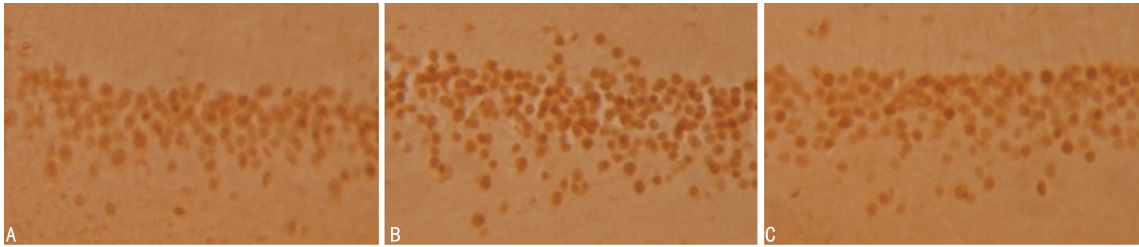
^{*}: $P < 0.05$, [#]: $P < 0.01$, 与 NMDA(0.1 mmol/L) 比较



A: NMDA 损伤前; B: NMDA 损伤 4 min; C: NMDA 损伤 20 min; D: NMDA 损伤后 2 h

图 1 NMDA 损伤时海马脑片 OPS 的变化

2.4 丙泊酚对 NMDA 毒性损伤后脑片 BDNF 表达的影响 在对照组海马脑片上 CA1 区 BDNF 阳性细胞有表达。在损伤组加入 NMDA(1 mmol/L)后海马



A: 对照组; B: 丙泊酚组(10 μmol/L); C: 损伤组

图 2 NMDA 损伤时海马脑片 BDNF 表达的变化(SP 法×200)

3 讨 论

在离体海马脑片上,当电刺激 CA3 锥体细胞发出的 Schaffer 侧枝纤维时,通过突触传递,可在 CA1 锥体细胞层记录到顺向诱发的场电位,即 OPS。海马 CA1 区是脑损伤的敏感区域,而损伤后 OPS 的振幅值大小代表突触传递功能的恢复程度^[8-9]。实验中在灌流液中加入浓度为 0.1 mmol/L NMDA 后海马 CA1 区 OPS 振幅增加,提示激动 NMDA 受体,产生兴奋神经元作用。随着 NMDA 浓度增加,过度激动 NMDA 受体,转而抑制脑片神经元的 OPS,去除 NMDA 后,脑片组织有明显损伤,OPS 恢复程度低,提示对突触传递产生明显抑制效应而表现毒性作用。

丙泊酚作为全身麻醉药物主要通过抑制中枢的兴奋性突触传导和(或)加强抑制性突触传递而发挥麻醉作用^[10]。有研究表明,丙泊酚通过激活抑制性 γ-氨基丁酸受体(GABAA 受体)影响离子型 NMDA 受体通道电流,对 NMDA 受体通道也有直接抑制作用^[11-12],丙泊酚可通过抑制 NDMA 受体,从而保护神经细胞。本实验中丙泊酚可明显减轻脑片组织损伤,提高海马 CA1 区 OPS 恢复程度,提示丙泊酚可拮抗 NMDA 诱导的兴奋性毒性作用,从而减轻细胞损伤,有利于突触传递功能的恢复。

有研究表明,BDNF 可增强海马突触后 NMDA 受体的磷酸化,迅速增加神经元之间的突触传递^[13]。在脑损伤发生时可导致 BDNF 的表达广泛增加,而且

脑片 BDNF 阳性细胞表达略有增高,但与对照组相比无明显差异($P>0.05$)。丙泊酚(5、10 μmol/L)可使 BDNF 阳性细胞表达明显增多,染色加深,与损伤组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见表 2、图 2。

表 2 丙泊酚对 NMDA 毒性损伤后海马脑片损伤率、OPS 振幅和 BDNF 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	损伤率 (%)	OPS 振幅 (%)	BDNF 表达
对照组	0	100.0±2.4	12.4±2.3
损伤组	49.6±4.7	18.9±7.4 [△]	13.9±2.9
丙泊酚组			
1 μmol/L	41.2±3.6	26.3±9.7	15.3±2.5
5 μmol/L	29.5±2.8 [#]	79.5±17.5 [#]	17.5±3.1 [*]
10 μmol/L	18.7±1.2 [#]	93.1±27.6 [#]	20.6±2.8 [#]

^{*}: $P<0.05$, [#]: $P<0.01$, 与损伤组比较; [△]: $P<0.01$, 与对照组比较

脑组织抵抗损伤的能力与 BDNF 表达水平呈正相关^[14-15]。在实验中 NMDA 可使海马脑片 CA1 区 BDNF 表达增强,说明当神经元受到外来因素损伤时 BDNF 水平提高是一种保护性反应。丙泊酚可使 BDNF 表达明显增强,从而提高脑内 BDNF 的表达尤其是脑内易损区的 BDNF 表达,可能是其保护作用的重要途径之一。

当细胞外液中 NMDA 水平持续增高,构成 NMDA 毒性环境,造成细胞损伤,抑制细胞间的突触传递,而此时细胞的自我保护机制亦启动,BDNF 的表达开始增加。本实验结果提示,丙泊酚可通过增强 BDNF 的表达,减轻神经元的损伤,使得神经突触之间的连接保持正常,从而促进突触传递效能的恢复。

参考文献

[1] DENG F, WANG S, ZHANG L, et al. Propofol through up-regulating caveolin-3 attenuates post-hypoxic mitochondrial damage and cell death in H9C2 cardiomyocytes during hyperglycemia[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(1): 279-292.

[2] LI VOLTIG, AVOLA R, TIBULLO D. Editorial - Propofol as an intraoperative strategy for organ protection[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(17): 3980-3981.

[3] JEON Y K, HA C H. The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents[J]. Environ Health Prev Med, 2017, 22(1): 27.

[4] DONG D, MAO Y, HUANG C, et al. (下转第 3758 页)

- with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms [J]. *Hematology*, 2017, 9(1):1-4.
- [3] THIELE J, KVASNICKA H M. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2009, 4(1):33-40.
 - [4] QUINTÁSCARDAMA A, KANTARJIAN H, MANSHOURI T, et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(32):5418-5424.
 - [5] WANG W A, GROENENDYK J, MICHALAK M. Calreticulin signaling in health and disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44:842-846.
 - [6] FALCHI L, KANTARJIAN H M, VERSTOVSEK S. Assessing the thrombotic risk of patients with essential thrombocythemia in the genomic era [J]. *Leukemia*, 2017, 31(9):1845-1854.
 - [7] MELIKYAN A L, SUBORTSEVA I N, SUDARIKOV A B. Clinical features of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, depending on the molecular characteristics of disease [J]. *Ter Arkh*, 2017, 89(7):4-9.
 - [8] CLINTON A, MCMULLIN M F. The Calreticulin gene and myeloproliferative neoplasms [J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(10):841-845.
 - [9] 汤琴, 张修文, 夏雷, 等. 慢性骨髓增殖性肿瘤患者钙网蛋白基因突变及其临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(1):151-156.
 - [10] LARSEN T S, MØLLER M B, STRICKER K, et al. Minimal residual disease and normalization of the bone marrow after long-term treatment with alpha-interferon2b in polycythemia vera. A report on molecular response patterns in seven patients in sustained complete hematological remission [J]. *Hematology*, 2009, 14(6):331-334.
 - [11] SILVER R T, KILADJIAN J J, HASSELBALCH H C, et al. Interferon and the treatment of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelo? brosis [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 14(6):49-58.
 - [12] CASSINAT B, VERGER E, KILADJIAN J J. Interferon Alfa Therapy in CALR-Mutated Essential Thrombocythemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(2):188-189.
 - [13] SILVER R T, KILADJIAN J J, HASSELBALCH H C. Interferon and the treatment of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 6(1):49-58.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-06-16)

(上接第 3754 页)

- Astrocytes mediated the neurotrophic effects of Sarsapogenin-AA13 via upregulating brain-derived neurotrophic factor [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9):4015-4025.
- [5] 李金路, 谭莹, 衡新华. 丙泊酚对脑损伤大鼠认知功能及 BDNF 表达的影响 [J]. *昆明医科大学学报*, 2016, 37(8):30-34.
 - [6] ZHU L, YANG L, ZHAO X, et al. Xanthoceraside modulates NR2B-containing NMDA receptors at synapses and rescues learning-memory deficits in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2018, 235(1):337-349.
 - [7] SAFFARPOUR S, NASIRINEZHAD F. Functional interaction between N-methyl-D-aspartate receptor and ascorbic acid during neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2017, 28(6):601-608.
 - [8] 陈堃, 张志发, 廖明峰, 等. 低氧预处理减缓缺氧对大鼠海马突触功能抑制及其机制初探 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2017, 38(5):704-707.
 - [9] JIANG S, FANG D F, CHEN Y. Involvement of N-methyl-D-aspartic acid receptor and DL- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazole propionic acid receptor in ginsenosides Rb1 and Rb3 against oxygen-glucose deprivation-induced injury in hippocampal slices from rat [J]. *Pharmacology*, 2018, 101(3/4):133-139.
 - [10] 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.
 - [11] SATO Y, KOBAYASHI E, MURAYAMA T, et al. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor epsilon1 subunit gene disruption of the action of general anesthetic drugs in mice [J]. *Anesthesiology*, 2005, 102(3):557-561.
 - [12] DREXLER B, JURD R, RUDOLPH U, et al. Distinct actions of etomidate and propofol at beta3-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 57(4):446-455.
 - [13] 段金旗, 马丽琼, 刘远林, 等. TERT 基因转染 BMSC 血管性痴呆大鼠记忆功能及海马 CA1 区突触可塑性的影响 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(10):1300-1303, 1307.
 - [14] 窦超, 张敏, 赵源征, 等. 甲状腺激素 T3 对大鼠脑缺血再灌注损伤后 NGF 和 BDNF 表达的影响研究 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(15):2030-2033.
 - [15] HUANG Y, LI Z, NAN G. Effect of hippocampal L-NBP on BDNF and TrkB expression and neurological function of vascular dementia rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5):7673-7678.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-06-26)