

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.34.006

低温复合丙泊酚对大鼠海马神经元凋亡蛋白表达及超微结构变化的影响*

何亚¹, 刘晓颖^{2△}, 邓庆华², 郑小红², 蒋红艳², 苏溪洪², 彭兰²

(1. 重庆市渝北区人民医院麻醉科 401120; 2. 重庆医药高等专科学校 400030)

[摘要] 目的 观察低温复合丙泊酚对大鼠海马神经元凋亡蛋白 Caspase-3、自噬相关蛋白 Beclin 1 和 LC3-II 及其神经元超微结构变化的影响, 探讨丙泊酚对低温所致大鼠海马神经元自噬与凋亡的干预作用。方法 将大鼠分为空白对照组(A组)、低温丙泊酚组(B组)和低温水合氯醛组(C组), B、C 两组低温干预 30 min, 各组进行心脏灌注, 断头取脑, 制备大鼠海马神经元组织标本, 用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Caspase-3 的表达, 用 Western blot 检测 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白的表达, 透射电镜观察神经元超微结构的变化。结果 3 组 Caspase-3、Beclin-1 和 LC3-II 蛋白的水平差异有统计学意义($P < 0.05$); 透射电镜结果显示 B、C 组大鼠海马区神经元均有不同程度的改变, 尤其是 C 组神经细胞凋亡现象明显。结论 低温状态下海马神经元仍有一定的自噬与凋亡现象, 而丙泊酚则可减少这种损害, 具有较好的神经元保护作用。

[关键词] 低温; 异丙酚; 海马; 神经元; 细胞凋亡

[中图分类号] R641

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)34-4774-03

Effects of low temperature compound propofol on expression and ultrastructural changes of hippocampal neurons apoptosis protein in rats*

He Ya¹, Liu Xiaoying^{2△}, Deng Qinghua², Zheng Xiaohong², Jiang Hongyan², Su Yuanqi², Peng Lan²

(1. Department of Anesthesiology, the People's Hospital in Yubei District of Chongqing city, Chongqing 401120, China;

2. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of low temperature compound propofol on the changes of apoptosis protein Caspase-3, autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3-II and their changes of hippocampal neurons. **Methods** The rats were randomly divided into blank control group (Group A), propofol group at low temperature (Group B) and chloral hydrate group at low temperature (Group C), Group B and C were treated with low temperature for 30 min. Then, each group was subjected to cardiac perfusion and decapitated brain to prepare rat hippocampal neuronal tissue samples. The expression of Caspase-3 was detected by immunohistochemistry, Beclin-1 and LC3-II protein was detected by immunoblotting. The ultrastructural changes of neurons were observed by transmission electron microscopy. **Results** The expression of Caspase-3, Beclin-1 and LC3-II protein in each group were statistically significant differences ($P < 0.05$). The results of transmission electron microscopy showed that the neurons in group B and C were changed in different degrees, especially in group C neuronal apoptosis is obvious. **Conclusion** Autophagy and apoptosis in existence still exist in low temperature condition, while propofol can reduce this damage and have better protective effect on neurons.

[Key words] hypothermia; propofol; hippocampal; neurons; apoptosis

国内外大量研究都把低温当做一种器官保护措施, 因其可通过降低机体基础代谢率, 减少心脏做功, 减少脑组织的耗氧量, 增加细胞对缺氧的耐受力, 从而保护大脑及其他基础代谢率较高的器官免受缺血缺氧的损害^[1]。丙泊酚作为一种静脉全身麻醉药, 已广泛应用于临床各科的手术麻醉, 其脑保护作用也得到越来越多的研究证实^[2]。然而却很少有研究注意到低温同时带来的不良反应, 包括细胞的自噬与凋亡及在全身低温状态下丙泊酚对大脑神经细胞自噬与凋亡的干预。本研究通过建立大鼠丙泊酚和水合氯醛全身麻醉的亚低温模型, 检测海马神经元 Caspase-3、Beclin-1 和 LC3-II 蛋白的表达及透射电镜观察神经细胞超微结构的变化, 探讨丙泊酚对低温所致大鼠海马神经元自噬与凋亡的干预作用, 以便使低温和丙泊酚在临床上得到更好的应用, 提高疾病治愈率。

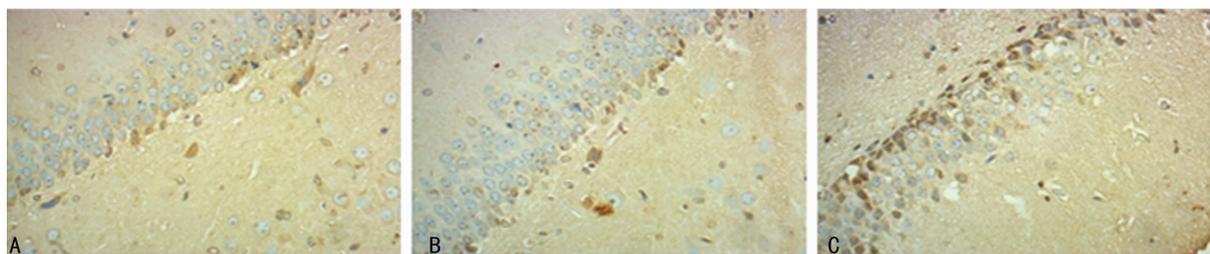
1 材料与方法

1.1 材料 丙泊酚(西安力邦制药有限公司, 产品批号 1107292); 10% 水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司, 产品批号 20141001)。一抗 Caspase-3、二抗(Daro 公司), 一抗 Beclin-1、LC3(Abcam 公司), 内参 GAPDH 一抗、HRP 二抗(Western Biotechnology 公司); DAB 显色试剂盒(Sigma 公司); 玻璃匀浆器(宁波新芝 DY89-1)、分光光度仪(上海欣茂 UV-7504)、垂直板电泳转移装置(上海天能)、电泳仪(北京君意 JY300C)、透射电子显微镜(第三军医大学生物测试分析中心)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠全身低温模型制作 2 个月龄 SD 健康雄性大鼠 60 只, 清洁级, 体质量 150~200 g, 由第三军医大学动物中心提供。大鼠共分为 3 组($n=20$), 即空白对照组(A组)、低温丙

* 基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目(KJ112502)。 作者简介: 何亚(1980-), 主治医师, 本科, 主要从事麻醉学研究。 △ 通信作者, E-mail: liuxiaoying@163.com。



A:A 组;B:B 组; C:C 组

图 1 3 组海马神经元 Caspase-3 的表达

泊酚麻醉组(B组)和低温水合氯醛麻醉组(C组)。其中每组 15 只大鼠用于测定海马神经元 Caspase-3、自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3-II 的表达,其余 5 只大鼠用于观察海马神经元的超微结构。A 组大鼠普通实验室喂养,不进行特殊处理,B 组和 C 组分别用丙泊酚(150 mg/kg)和 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射,然后均采用冰袋使大鼠肛温在 32 °C 保持 30 min^[3]。低温过程中用微量注射泵以 16 mL · kg⁻¹ · h⁻¹ 的速度腹腔注射平衡盐液,并观察大鼠生理机能状况。

1.2.2 免疫组织化学法检测 Caspase-3 蛋白的表达 各组大鼠观察 24 h 后分别进行水合氯醛腹腔麻醉开胸,暴露心脏经心尖将自制的灌注针插入主动脉,右心耳剪一小切口,依次用生理盐水 250 mL,4 °C 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液 250 mL 通过主动脉灌注固定。断头取脑^[4],将固定 6 h 后的海马组织经脱水、透明、浸蜡、包埋制作成石蜡块,将石蜡组织块进行连续冠状切片,采用免疫组织化学法检测 Caspase-3。按说明书操作,DAB 显色,光镜高倍镜视野连续计数 200 个神经元,阳性产物为棕黄色或棕褐色,背景为蓝色。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定阳性细胞的平均光密度值(average optical density,AOD),用 AOD 半定量 Caspase-3 蛋白的表达,AOD 越大,表示 Caspase-3 表达越强。反之表达越弱。计算出 3 个视野的 AOD 的平均值,代表该组神经元的 AOD 值。

1.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Beclin-1、LC3-II 的表达 取海马组织于无菌的 EP 管中,用 Western blot 及 IP 细胞裂解液(含 1%的 PMSF)浸泡,提取组织蛋白质样品,电泳转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,分别加入兔抗 LC3 单克隆抗体(1:300),兔抗 Beclin-1 多克隆抗体(1:1000),内参一抗的稀释终浓度为 1:3000,然后 4 °C 孵育过夜。洗膜后用封闭液将 HRP 二抗稀释(1:5000),然后温育(37 °C) 1.5 h,加 ECL

试剂,X 射线胶片显像,扫描。应用 Image J 分析软件分析目的条带和内参的灰度值,以目的条带和内参条带的灰度比值对 Beclin-1、LC3-II 进行半定量分析。

1.3 大鼠海马神经元超微结构观察 各组随机选择 5 只大鼠,取小块海马组织快速用 PBS 冲洗组织周围的血液等污物后立刻放入 2.5%的戊二醛固定液;2~3 min 后修整样品为 1 mm³,并放入新鲜的 3%戊二醛固定液。按常规透射电镜样品制备方法漂洗、锇酸固定、漂洗、脱水、浸透、Spon812 包埋,上机、拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经元 Caspase-3 及自噬相关蛋白的表达 A 组极少见到 caspase-3 阳性颗粒,与 A 组比较,B、C 组则可见神经元细胞膜和细胞质中有棕黄色或棕褐色颗粒。C 组 Caspase-3、Beclin-1、LC3-II 蛋白水平高于 A、B 组,B 组各蛋白水平高于 A 组,比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1、2,表 1。

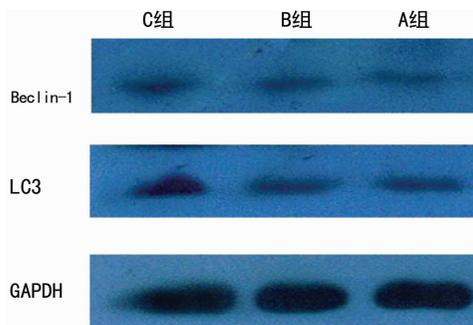
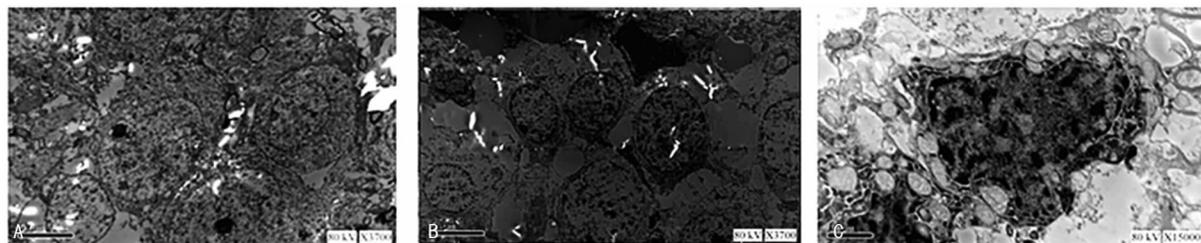


图 2 3 组海马神经元 Western blot 结果



A:A 组;B:B 组; C:C 组

图 3 3 组海马神经元超微结构变化

2.2 各组大鼠海马神经元超微结构变化 A 组大鼠海马神经元多为圆形,结构正常,核圆,核仁居中,细胞膜完整,各种细胞器丰富,排列整齐无水肿(图 3A);B 组超微结构损伤较轻,神

经元可见轻度破坏,核固缩,细胞核的染色质高度凝聚、边缘化(图 3B)。C 组细胞凋亡现象明显,可见细胞皱缩、核固缩、核内染色质分布欠均匀,核仁消失,细胞质浓缩,细胞核裂解,产生

凋亡小体(图 3C)。

表 1 3 组海马神经元 Caspase-3、Beclin-1、LC3- II 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	Caspase-3 [*]	Beclin-1 [#]	LC3- II [#]
A 组	0.081±0.015	0.128±0.04	0.160±0.06
B 组	0.102±0.011 ^a	0.172±0.003 ^a	0.217±0.06 ^a
C 组	0.148±0.024 ^{ab}	0.236±0.08 ^{ab}	0.279±0.08 ^{ab}

^a: $P<0.05$,^b: $P<0.01$,与 A 组比较;^c: $P<0.05$,与 B 组比较;* : AOD 值;#: 相对灰度值

3 讨 论

细胞凋亡是受各种基因调控的程序化死亡过程,而激活后的 Caspase-3 是细胞凋亡的特征性标志之一,为凋亡途径的最终执行者。自噬现象是一种高度保守的细胞行为^[5],在维护细胞内环境、实现细胞代谢和细胞器的更新方面起着非常重要的作用。但过度激活的自噬则可导致细胞程序性死亡,从而引起一系列疾病。因此检测凋亡蛋白 Caspase-3 的表达和自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3- II 的表达及透射电镜观察海马神经元超微结构的变化,可以探索低温下海马神经元自噬与凋亡的发生情况。

丙泊酚是短效静脉麻醉药,广泛应用于诱导麻醉和维持重症监护中患者的镇静,丙泊酚的神经保护功能在许多体内外研究模型中已得到证实^[6-7]。本实验采用丙泊酚和水合氯醛作为诱导全身低温时的全身麻醉药,比较两组大鼠低温后海马神经元凋亡蛋白、自噬相关蛋白表达和神经元超微结构变化的差异,求证丙泊酚对低温所致大鼠海马神经元自噬与凋亡的干预作用。

实验中 B、C 两组 Caspase-3 和 Beclin-1、LC3- II 阳性表达均高于 A 组,其神经元超微结构的损害也较 A 组重,这表明低温下海马神经元仍然存在一定的自噬与凋亡现象,这种变化有可能是低温手术产生不良反应的病理基础,还有研究发现低温对心肌缺血的改善并不明显,还可导致外周血管痉挛,增加外周血管阻力,使周围循环灌注降低^[8],外周组织细胞缺血、缺氧及营养物质缺乏,这些不仅导致酸性物质增加,也可能造成自噬与凋亡的发生。故利用低温进行缺血、缺氧性脑病^[9]的治疗时,其给神经细胞带来的损伤作用也不可忽视。

实验结果中, C 组 Caspase-3、Beclin-1、LC3- II 的表达强于 B 组,其神经元超微结构的损害也较 B 组重,透射电镜还发现 C 组海马神经元有明显的损害,可见凋亡小体形成。提示水合氯醛对海马神经细胞自噬与凋亡并无保护作用^[10]。B 组丙泊酚复合低温后海马神经元的 Caspase-3、Beclin-1、LC3- II 蛋白表达与 C 组相比呈下调趋势,表明自噬与凋亡程度减轻,神经元超微结构损伤也轻,较好地表现出丙泊酚对低温所致神经元自噬与凋亡的干预作用,这可能因丙泊酚减少 Caspase-3、Beclin-1、LC3- II 的表达拮抗神经元凋亡所致,其机制与丙泊酚的抗自由基、抑制细胞内的钙超载^[11]、抑制 GABA 再摄取^[12]、拮

抗 Na⁺内流、抑制经典神经递质 Ach 和儿茶酚胺类的突触传递、拮抗内皮素等多个环节有关。当然,低温下出现的神经细胞自噬与凋亡现象是否为细胞的应激反应,还需对低温持续时间、不同的药物剂量、不同的时相对海马神经元自噬与凋亡的影响作进一步研究,以便将低温与丙泊酚合理应用于临床手术中,达到更好的脑保护效应,减少全身低温给术后带来的不良反应,增加手术的成功率。

参考文献

- [1] 任文博,刘振林,赵玉军. 亚低温脑保护在重型创伤性颅脑损伤治疗中的应用[J]. 现代诊断与治疗, 2012, 23(12):2102-2103.
- [2] 刘晓旭,林春水. 丙泊酚对神经元凋亡的保护作用[J]. 临床医药文献杂志, 2016, 3(17):3524-3525.
- [3] 王伟平,李世英,陶颖媛,等. 亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑保护的实验研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(28):2956-2958.
- [4] 邓小园,陈博,刘虹亮,等. TNF- α 在丙泊酚诱发的神经元凋亡及认知功能障碍中的作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(7):945-949.
- [5] 巧青,冯震博. 自噬基因 Beclin 1 的研究现状[J]. 当代医学, 2010, 16(9):21-22.
- [6] Harman F, Hasturk AE, Yaman M, et al. Neuroprotective effects of propofol, thiopental, etomidate, and midazolam in fetal rat brain in ischemia-reperfusion model[J]. Childs Nerv Syst, 2012, 28(7):1055-1062.
- [7] He J, Huang C, Jiang J, et al. Propofol exerts hippocampal neuron protective effects via up-regulation of metallothionein-3[J]. Neurol Sci, 2013, 34(2):165-171.
- [8] 庄心良,曾因明,陈伯銮. 现代麻醉学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 1987.
- [9] 周天恩,张萌,杨正飞,等. 亚低温减轻氧糖剥夺所致的大鼠海马神经元损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(7):1165-1170.
- [10] 潘庆军,朱学芝,刘渊. 水合氯醛诱发 RAW264. 7 巨噬细胞凋亡及其机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(2):121-126.
- [11] Wakita M, Kotani N, Nonaka K, et al. Effects of propofol on GABAergic and glutamatergic transmission in isolated hippocampal single nerve-synapse preparations[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 718(1/3):63-73.
- [12] 乔霖,赵薇,王新生,等. 丙泊酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其 Caspase3 表达干预机制的研究[J]. 现代药理学与临床, 2015, 30(6):629-632.

(收稿日期:2017-08-04 修回日期:2017-09-12)