

丙泊酚对原代培养大鼠皮层神经元 BDNF 和 p75NTR 水平的影响

李建立¹, 崔红赏², 王 蓓³, 吴红海⁴, 侯艳宁⁴

摘要 目的 探讨丙泊酚对原代培养大鼠皮层神经元凋亡的影响及可能机制。方法 原代培养 7 d 的大鼠皮层神经元, 随机分为两组: 溶剂对照组(给予相同容积的 20% 脂肪乳剂), 丙泊酚组(丙泊酚终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$)。上述药物处理皮层神经元 12 h 后, 用光学显微镜观察两组皮层神经元的形态学变化, MTT 法检测神经元存活率的变化, Western blot 法检测神经元脑源性神经营养因子(BDNF)、p75 神经营养因子受体(p75NTR)以及 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)蛋白水平的变化。结果 与溶剂对照组比较, 丙泊酚组镜下观察显示皮层神经元数量明显减少, 胞体立体感消失, 细胞轮廓不清, 神经元轴突断裂。神经元存活率显著性下降($P < 0.01$), BDNF 和 Bcl-2 蛋白水平显著性下降($P < 0.01$), p75NTR 蛋白水平显著性增加($P < 0.01$)。结论 丙泊酚可引起发育期原代培养皮层神经元损伤, 其机制可能与下调 BDNF、Bcl-2 和上调 p75NTR 蛋白水平有关。

关键词 原代培养皮层神经元; 丙泊酚; 神经凋亡; BDNF; p75NTR; Bcl-2

中图分类号 R 971.2; R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0818-04

全世界每年有众多患儿由于各种原因需要接受全身麻醉。丙泊酚通过激动 γ 氨基丁酸 A 型受体和抑制 N-甲基-D-天冬氨酸受体发挥麻醉作用。丙泊酚因具有起效快、消除快、不良反应少等优点, 被广泛用于麻醉诱导和维持。虽然药典显示丙泊酚慎用于 3 岁以下患儿, 但在实际临床工作中, 丙泊酚被广泛应用于婴幼儿麻醉。目前有关丙泊酚是否具有发育期神经毒性、对发育期大脑产生神经损伤观点不一。最近体外细胞研究^[1-3]表明丙泊酚可诱导原代培养神经元产生凋亡样损伤, 但其机制尚未完全明确。作为神经营养因子家族的一员, 脑源性神经

营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的含量最为丰富, 广泛分布于中枢神经系统, BDNF 对神经元的发育、存活、分化等发挥着重要的作用, 具有保护神经元免受外界环境刺激的损伤以及促进受损神经元再生的功能^[4]。该研究拟通过观察丙泊酚对发育期原代培养皮层神经元以及对 BDNF、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和 p75 神经营养因子受体(p75 neurotrophic receptor, p75NTR)蛋白水平的影响, 探讨丙泊酚发育期神经毒性的发生机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 丙泊酚(diprivan, 批号: KW814)购自意大利 AstraZeneca 公司; 20% 脂肪乳购自广州百特公司; DMEM 培养液、胎牛血清、Neurobasal 培养液、 B_{27} 促生长剂购自美国 Gibco 公司; DMSO、MTT 购自美国 Sigma 公司; 胰蛋白酶购自北京索来宝公司; 微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP-2)、BDNF、Bcl-2 和 p75NTR 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 皮层神经元原代培养 取新生的 SD 幼鼠(24 h 内) 大脑双侧额叶皮质, 在冷 PBS 液中洗剂, 剪碎, 置入 0.125% 胰蛋白酶中, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内充分消化 15 min, 然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化, 吸弃上清液, 然后把细胞转移到含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 用巴氏滴管轻轻吹打细胞制成细胞悬液。然后经 100 目钢丝筛过滤, 计数后按 $1 \times 10^9 / \text{L}$ 的密度接种于经多聚赖氨酸处理的培养板中, 置于 5% CO_2 培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后, 全量换 Neurobasal + B_{27} 培养基培养, 以后每隔 2 d 半量换液 1 次。体外培养 7 d 的神经元用于实验。

1.3 实验分组 随机分为溶剂对照组(给予相同容积的 20% 脂肪乳剂), 丙泊酚组(丙泊酚终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$)。

1.4 免疫组化鉴定皮层神经元 体外培养 7 d 的皮层神经元用多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 遍, 每

2016-01-18 接收

基金项目: 河北省卫生厅指令课题(编号: ZL20140095)

作者单位: 河北省人民医院¹ 麻醉科、² 胸外科、³ 妇产科, 石家庄 050051

⁴ 白求恩国际和平医院药剂科, 石家庄 050082

作者简介: 李建立, 男, 副教授, 医学博士;

侯艳宁, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: biph2011@163.com

次 5 min ,然后用 10 % 山羊血清封闭 30 min ,PBS 洗 3 遍 ,每次 5 min ,加入鼠抗 MAP-2(1 : 200) 4 °C 过夜。PBS 洗 3 遍 ,每次 5 min ,然后加入荧光二抗(1 : 100) 37 °C 孵育 1 h ,PBS 洗 3 遍 ,每次 5 min ,荧光显微镜下观察 ,计数。

1.5 光镜显微镜下观察不同药物处理后皮层神经元的形态变化 将细胞接种于 6 孔板 ,体外培养至 7 d ,按上述分组方法分别加入不同的药物处理 12 h ,在光镜显微镜下观察不同药物处理后皮层神经元的形态变化。

1.6 MTT 法检测神经元存活率 将细胞接种于 96 孔板 ,体外培养至 7 d ,按上述分组方法分别加入不同的药物处理 12 h ,移去培养液 ,每孔加入 10 μl MTT 液 ,37 °C 孵育 4 h ,加入 200 μl DMSO 轻轻振荡溶解甲臜结晶 ,在多功能酶标仪上测定 570 nm 的吸光度(optical density ,OD) 值。以对照组平均 OD 值为 100% ,细胞存活率(%) = 处理组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

1.7 Western blot 法测定 BDNF、Bcl-2 和 p75NTR 蛋白含量 神经元经各种处理后 ,收集神经元 ,细胞裂解液裂解细胞 ,提取总蛋白 ,用 BCA 法检测蛋白含量。取待测蛋白质 50 μg 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 2 h ,加入 BDNF、Bcl-2 和 p75NTR 抗体(1 : 1 000) 4 °C 过夜 ,常规洗涤 ,加羊抗鼠二抗(1 : 5 000) 37 °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照条带 OD 比值。实验重复 3 次 ,设 β-actin 蛋白为内参。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 原代培养皮层神经元鉴定 MAP-2 行原代培养大鼠皮层神经元鉴定 ,神经元纯度 > 90%。

2.2 丙泊酚对原代培养皮层神经元形态的影响 原代培养 7 d 的大鼠皮层神经元经丙泊酚处理 12 h 后在光学显微镜下观察 ,显示溶剂对照组神经元生长良好 ,神经元胞体丰满 ,突起较长 ,相互之间形成复杂的神经网络。丙泊酚组神经元生长状态差 ,神经元胞体立体感消失 ,颜色变暗 ,细胞轮廓不清 ,神经元轴突断裂 ,部分神经元出现死亡。见图 1。

2.3 丙泊酚对皮层神经元存活率的影响 与对照组(99.8 ± 4.1) % 比较 ,丙泊酚组神经元存活率

(54.4 ± 6.4) % 显著性下降 ($t = 8.457, P < 0.01$)。见图 2。

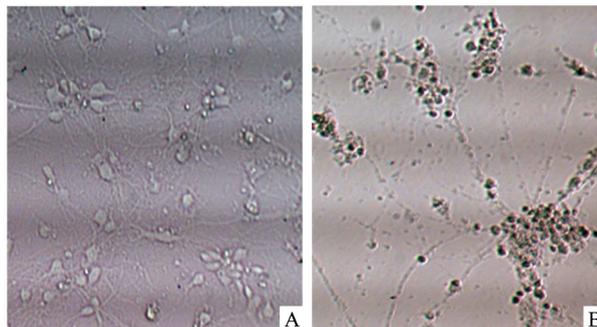


图 1 不同处理对皮层神经元形态的影响 × 200
A: 溶剂对照组; B: 丙泊酚组

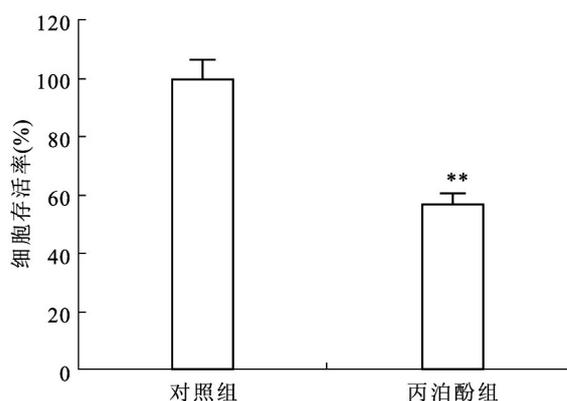


图 2 丙泊酚对神经元存活率的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 丙泊酚对皮层神经元 BDNF 蛋白水平的影响 与对照组比较 ,丙泊酚组皮层神经元 BDNF 蛋白水平显著性下降($t = 7.892, P < 0.01$)。见图 3。

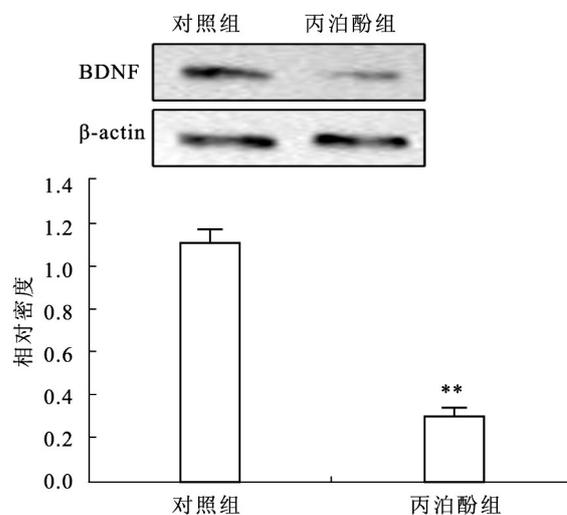


图 3 丙泊酚对神经元 BDNF 表达的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 丙泊酚对皮层神经元 Bcl-2 蛋白水平的影响
与对照组比较,丙泊酚组皮层神经元 Bcl-2 蛋白水平显著性下降 ($t = 4.215, P < 0.01$)。见图 4。

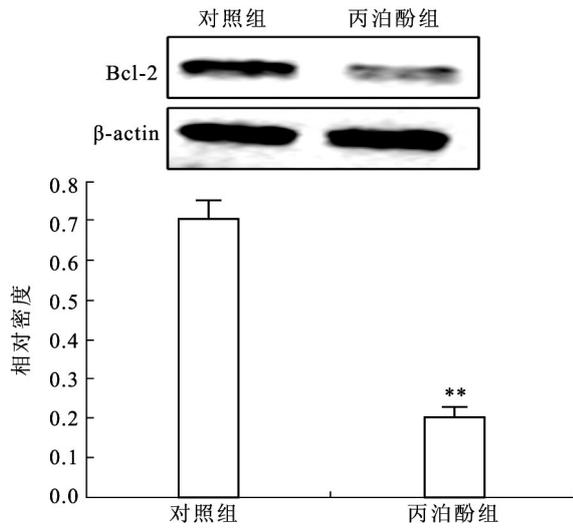


图 4 丙泊酚对神经元 Bcl-2 表达的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.6 丙泊酚对皮层神经元 p75NTR 蛋白水平的影响
与对照组比较,丙泊酚组皮层神经元 p75NTR 蛋白水平显著性增加 ($t = 8.432, P < 0.01$)。见图 5。

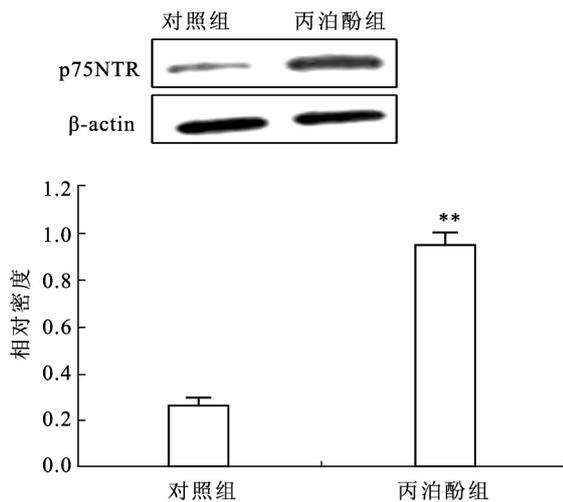


图 5 丙泊酚对神经元 p75NTR 表达的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)
与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

麻醉药是否影响发育期神经元,影响突触的形成,是目前临床和基础研究的一个重要课题。近年来一些研究^[5]表明全麻药具有发育期神经毒性,可

诱导发育期大脑神经损伤。丙泊酚作为临床上常用的一种全身麻醉药,具有起效快、消除迅速和不良反应少的优点,成为小儿麻醉时常用的麻醉药之一。丙泊酚是否适合应用于新生儿和婴幼儿的全身麻醉,目前仍存在争议。最近动物实验研究^[6-8]表明丙泊酚可对发育期动物大脑广泛脑区产生凋亡样损伤,并引起动物成年后的学习记忆功能障碍。为进一步了解丙泊酚是否可对发育期大脑产生神经损伤,该研究拟观察丙泊酚对原代培养皮层神经元的损伤作用以及与 BDNF、Bcl-2 和 p75NTR 蛋白变化的关系,结果显示丙泊酚通过降低 BDNF、Bcl-2 和增加 p75NTR 蛋白水平引起神经元形态学损伤,同时引起神经元存活率接近 50% 的下降。

关于丙泊酚引起发育期神经元损伤的机制目前仍不清楚。神经营养因子包括神经生长因子、BDNF、神经生长因子-3 和碱性成纤维细胞生长因子等。BDNF 作为在神经系统主要表达的神经营养因子,广泛存在于大脑皮层和海马组织,对神经元的增殖和存活发挥着重要的作用^[9]。BDNF 与 TrkB 结合后启动细胞内信号转导途径包括激活转录因子 CREB,上调 Bcl-2 的表达,保护神经元免受外界刺激的损伤,发挥神经保护作用^[10]。Bcl-2 作为一种抗凋亡蛋白,存在于线粒体和内质网等结构,促进细胞存活、抑制细胞凋亡,其水平降低可能诱导细胞凋亡^[11]。以往研究^[1,12]表明丙泊酚引起发育期大鼠大脑神经损伤与 BDNF 和 Bcl-2 蛋白水平的下降有关。本实验结果显示与溶剂对照组比较,500 μmol/L 丙泊酚作用神经元 12 h 引起神经元 BDNF 和 Bcl-2 蛋白水平的显著性下降,说明丙泊酚诱导皮层神经元损伤可能与神经元 BDNF 和 Bcl-2 蛋白水平的下降有关。神经营养因子低亲和力受体 p75NTR 属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,是已知最早分离出来的神经营养因子受体,在发育过程中呈高表达,随着发育过程的结束其表达量逐渐降低。p75NTR 在神经系统中广泛分布,以往认为 p75NTR 与神经营养因子作用一致,二者结合后会促进神经元的存活与分化。然而近年来显示在一些中枢神经疾病的发病过程中 p75NTR 的表达增加,敲除或阻断 p75NTR 信号可促进神经元存活,延缓疾病的发生^[13]。p75NTR 表达增加可促进神经元凋亡。研究^[14-15]表明全身麻醉药异氟醚以及咪达唑仑,异氟醚和笑气联合应用诱导的发育期大鼠大脑广泛脑区凋亡样损伤可能与 p75NTR 蛋白水平的增加有关。本实验结果显示与溶剂对照组比较,500 μmol/L 丙

泊酚作用神经元 12 h 引起神经元 p75NTR 蛋白水平的明显增加,说明丙泊酚诱导皮层神经元损伤也可能与神经元 p75NTR 蛋白水平增加有关。

综上所述,丙泊酚可诱导原代培养皮层神经元损伤,其机制可能与 BDNF 和 Bcl-2 蛋白水平的下降和 p75NTR 蛋白水平增加有关。

参考文献

- [1] Zhong Y, Liang Y, Chen J, et al. Propofol inhibits proliferation and induces neuroapoptosis of hippocampal neurons *in vitro* via downregulation of NF- κ B p65 and Bcl-2 and upregulation of caspase-3 [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8): 720-9.
- [2] 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): 680-8.
- [3] 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): 488-90.
- [4] Zheng F, Zhou X, Moon C, et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2012, 4(4): 188-200.
- [5] 孙文冲, 裴凌. 全身麻醉药对发育大脑神经细胞的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(4): 409-11.
- [6] Hung J, Jing S, Chen X, et al. Propofol administration during early postnatal life suppresses hippocampal neurogenesis [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 53(2): 1031-44.
- [7] Karen T, Schlager G W, 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.
- [8] Milanovic D, Pesic V, Popic J, et al. Propofol Anesthesia induces proapoptotic tumor necrosis factor- α and pro-nerve growth factor signaling and prosurvival Akt and XIAP expression in neonatal rat brain [J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92(10): 1362-73.
- [9] 黄斐, 马广文, 尹宗生等. 脑源性神经营养因子缓释胶原凝胶支架对神经干细胞生长和分化的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5): 586-90.
- [10] Teng H K, Teng K K, Lee R, et al. p75NTR induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(22): 5455-63.
- [11] Fu Y, Lin F, Liu H. Changes in the messenger RNA expression levels of bcl-2 family members and caspase-8 and -3 in porcine-ovarian follicles during follicular atresia [J]. *Anim Sci J*, 2013, 84(3): 222-30.
- [12] Popic J, Pesic V, Milanovic D, et al. Propofol-induced changes in neurotrophic signaling in the developing nervous system *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34396.
- [13] Chiaretti A, Piastra M, Polidori G, et al. Correlation between neurotrophic factor expression and outcome of children with severe traumatic brain injury [J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29(8): 1329-38.
- [14] Lemkuil B P, Head B P, Pearn M L, et al. Isoflurane neurotoxicity is mediated by p75NTR-RhoA activation and actin depolymerization [J]. *Anesthesiology*, 2011, 114(1): 49-57.
- [15] Lu L X, Yon J H, Carter L B, et al. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(9): 1603-15.

Effects of propofol treatment on BDNF and p75NTR expression in primary cultured cortical neurons

Li Jianli¹, Cui Hongshang², Wang bei³, et al

(¹Dept of Anesthesiology, ²Dept of Thoracic Surgery, ³Dept of Gynecology Hebei General Hospital, Shi Jiazhuang 050051)

Abstract Objective To investigate the effect of propofol exposure on neuroapoptosis in primary cultured cortical neurons and the mechanisms. **Methods** Cortical neurons were primarily cultured for seven days, then divided into two groups: vehicle-control group (treated with equal volume of 20% intralipid), propofol-treated group (treated with 500 μ mol/L propofol). The neurons were treated for 12 h. The structure of neurons was analyzed using microscope, the neuron viability was determined by MTT, and Western blot was performed to detect the levels of BDNF, p75NTR and Bcl-2. **Results** Lack of three-dimensional sense, faded color, unclear outline were observed, and fractured neuron axons or neurons death were observed in neurons treated by 500 μ mol/L propofol. Compared with vehicle-control group, the neuron viability decreased greatly ($P < 0.01$), BDNF and Bcl-2 levels decreased greatly ($P < 0.01$) and p75NTR level increased greatly in propofol treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** Propofol induces neuroapoptosis in primary cultured cortical neurons, which is associated with the decreased levels of BDNF and Bcl-2 and the increased level of p75NTR.

Key words primary cultured cortical neurons; propofol; neuroapoptosis; BDNF; p75NTR; Bcl-2