

JNK 通路促进乳化异氟烷引起的大鼠胚胎神经干细胞的增殖抑制

周磊, 杨泽勇, 李元海

摘要 目的 探讨乳化异氟烷(EI)对原代培养的SD大鼠胚胎神经干细胞增殖的影响以及JNK通路在此影响中的作用。**方法** 建立体外培养胚胎神经干细胞接受EI处理的模型,分为6组($n=8$):正常组(N组)、脂肪乳组(F组)、EI处理组(8.12、9.80、12.04 mmol/L EI)、9.80 mmol/L EI组+20 μ mol/L SP600125组(EISP组)。细胞处理12 h后,采用噻唑蓝(MTT)法分别检测6组胚胎神经干细胞的细胞活力;流式细胞术检测细胞的凋亡率;Western blot法定量检测Caspase-3蛋白表达。实验重复3次。**结果** 与N组比较,F组各项指标无显著差异,EI组细胞增殖的抑制率明显升高($P<0.01$),EI组细胞的凋亡率明显升高($P<0.01$),EI组明显上调Caspase-3的表达量($P<0.05$);EI组内3个浓度之间比较,细胞增殖的抑制率($P<0.01$)、细胞的凋亡率以及Caspase-3的表达量差异均有统计学意义($P<0.05$);与EI组比较,EISP组细胞增殖的抑制率明显下降($P<0.05$),EISP组细胞的凋亡率明显降低($P<0.01$),EISP组明显下调Caspase-3的表达量($P<0.05$)。**结论** EI引起的SD大鼠胚胎神经干细胞的增殖抑制具有一定的浓度依耐性,并且与JNK通路相关。

关键词 胚胎神经干细胞; 乳化异氟烷; JNK; 增殖抑制; 凋亡

中图分类号 R 979.9; R 982

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1434-05

异氟烷是目前临床上应用十分广泛的一种吸入性麻醉药,近年来多项研究^[1-2]证实,异氟烷在发挥麻醉效应的同时,有可能会产生神经毒性和脑损伤。研究^[3]表明,妊娠期大鼠接受高浓度异氟烷麻醉后,大鼠后代中会产生明显的空间记忆和学习能力障碍,并伴随有多发的神经退行性疾病。针对异氟烷对新生儿神经发生以及认知功能影响的研究显得尤为重要。乳化异氟烷(emulsified isoflurane, EI)是异氟烷的静脉制剂,具有浓度配比准确、可控性强、实验稳定性和安全性可靠等优点^[4-6],该实验采用体外原代培养大鼠胚胎神经干细胞EI处理模型,利

用JNK通路化学性阻滞剂SP600125,观察EI对胚胎神经干细胞增殖的影响及与JNK通路之间的联系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 细胞培养瓶、96孔板、0.22 μ m微孔滤膜和针头滤器(美国Corning公司);恒温振荡器、细胞培养箱、离心机(上海精密科学仪器有限公司);超净工作台(苏州净化设备有限公司);倒置显微镜(日本OLYMPUS公司);胚胎神经干细胞试剂套装、CELLstart CTS试剂(美国Invitrogen公司);SP600125、anti-Caspase-3鼠抗、anti-Nestin鼠抗(德国Sigma公司);流式双染凋亡试剂盒(美国BD公司);EI(四川大学华西医院);脂肪乳(江苏华瑞制药公司)。

1.2 大鼠胚胎神经干细胞培养及鉴定 购得大鼠胚胎神经干细胞株,存储于液氮罐中。完全培养基配制包含:KnockOut DMEM/F12、GlutaMAX-I、bFGF、EGF,从液氮罐中取出细胞,立即转移到37℃水浴锅中以防结晶形成,在水浴锅中快速解冻,时间应小于2 min。解冻后迅速将细胞转移至15 ml离心管中,加入预热的完全培养基至10 ml,离心,弃上清液,判断细胞活性,将细胞悬液接种于使用CELLstart处理过的25 cm培养瓶中,根据所需细胞浓度加入完全培养基,放置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,至少让细胞贴壁24 h,第2天使用等量、新鲜、预热的完全培养基换液,培养3~4 d,观察细胞融合70%~90%时,进行传代。细胞传至3~5代,显微镜下观察细胞形态,并进行免疫荧光检测。吸去培养液,用PBS清洗3次,各2 min,用4%多聚甲醛固定20 min,继续用PBS清洗3次,每次2 min,然后用封闭液孵育15~20 min,吸去封闭液,加入神经干细胞特异性一抗anti-Nestin鼠抗(1:500),4℃孵育48 h,加入二抗(FITC偶联的抗鼠IgG 1:200),室温下避光孵育1 h, PBS洗脱,使用DAPI(5 μ g/L)对细胞核染色, PBS洗脱,置于荧光显微镜下观察,经过激发,75%的细胞表现出Nestin阳性,以此确定实验所用胚胎神经干细胞保持了绝大多数的未分化表型。

2015-06-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81401279)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院麻醉科, 合肥 230022

作者简介: 周磊,男,硕士研究生;

李元海,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: liyuanhai-1@163.com

1.3 实验分组 根据文献依据和预实验结果^[6-8], 本实验选取 EI 工作浓度分别为 8.12、9.80、12.04 mmol/L, SP600125 工作浓度为 20 μ mol/L。取同一批培养的细胞, 随机分为 6 组($n=8$), 正常组(N 组): 正常细胞, 继续培养 12 h; 脂肪乳组(F 组): 培养液中加入脂肪乳, 余同 N 组; EI 处理组(8.12、9.80、12.04 mmol/L EI): 培养液中分别加入 3 个浓度的 EI, 处理时间为 12 h, 余同 N 组; 9.80 mmol/L EI 组 + 20 μ mol/L SP600125 组(EISP 组): 培养液中加入 9.80 mmol/L EI 组和 20 μ mol/L SP600125, 余同 N 组。

1.4 观察指标 取出细胞, 噻唑蓝(MTT)法检测细胞的活性, 流式细胞仪检测细胞的凋亡率, Western blot 法检测细胞 Caspase-3 的表达。

1.4.1 MTT 法操作步骤 ① 收集生长状态良好的胚胎神经干细胞, 消化并调整细胞悬液浓度, 分于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 5 000 个细胞/孔; ② 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养过夜后, 小心弃去培养基; ③ 根据异氟醚在细胞溶液中的终浓度使用脂肪乳配制相应的药物储备液, 随后加入各培养液中形成不同浓度的工作液(异氟醚在工作液中的体积比为 5%)。每孔细胞分别加入 100 μ l 相应的工作液, 每种浓度均设 7 个复孔。同时设置脂肪乳对照组(脂肪乳在细胞培养液中的体积比为 5%)、正常培养孔(只加入完全培养液)和空白孔(没有细胞, 只加入等量的完全培养液)。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 12 h 后小心吸去上清液, 加入 80 μ l 新鲜培养液和 20 μ l MTT 溶液(5 mg/ml), 并继续培养 4 h; ④ 然后吸掉上清液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶标仪 490 nm 处测量各孔的光密度(optical density, OD)值; ⑤ 计算细胞生长抑制率(%) = $1 - (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$

1.4.2 流式细胞术操作步骤 ① 收集生长状态良好的胚胎神经干细胞, 消化并调整细胞悬液浓度, 分于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 5 000 个细胞/孔; ② 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养过夜后, 小心弃去培养基; ③ 根据异氟醚在细胞溶液中的终浓度使用脂肪乳配制相应的药物储备液, 随后加入各培养液中形成不同浓度的工作液(异氟醚在工作液中的体积比为 5%)。每孔细胞分别加入 100 μ l 相应的工作液, 每种浓度均设 7 个复孔。同时设置脂肪乳对照组(脂肪乳在细胞培养液中的体积比为 5%)、正常培养孔(只加入完全培养液)和空白孔(没有细胞, 只

加入等量的完全培养液)。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 12 h 后小心吸去上清液, 用 1 ml PBS 轻轻重悬细胞并计数, 然后高速离心 5 min, 收集细胞; ④ 加入 400 μ l $1 \times$ Binding Buffer 轻轻重悬细胞; ⑤ 加入 5 μ l AnnexinV-FITC, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min; ⑥ 加入 10 μ l PI 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置 5 min; ⑦ 30 min 内进行流式细胞仪检测, AnnexinV-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。流式细胞仪激发光采用激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm 检测 FITC 和 >575 nm 检测 PI。

1.4.3 Western blot 法操作步骤 ① 细胞蛋白上清液的制备和浓度测定: 每孔细胞中加入 100 μ l RIPA 裂解液, 充分裂解后使用细胞刮刀收集裂解液, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 取部分上清蛋白用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度; ② Western blot 法检测总蛋白中目的蛋白表达: 灌胶、电泳、转印蛋白及免疫检测。预先将 PVDF 膜浸泡在甲醇溶液中 15 s, 然后用 ddH₂O 漂洗 2 min, 浸泡于转移缓冲液中 5 min 后开始后续操作; 按黑面(负极)→海绵→滤纸→胶→PVDF 膜→滤纸→海绵→红面(正极)的顺序制备转膜“三明治”, 每层铺好后先赶走气泡再铺另一层, 将电转仪置于冰水中, 100 V 恒压转膜 1 h; 快速取出 PVDF 膜, 放入 5% BSA 室温封闭 2 h。取出膜, 于摇床上用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。孵育袋中加入 TBST 稀释的 phospho-SAPK/JNK(1:1 000)、4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗(1:3 000), 室温孵育 1 h, 膜于化学发光检测试剂反应至暗处出现亮条带, 取出膜, 甩去多余的液体, 用保鲜膜包好 PVDF 膜, 暗室中用 X 线片感光、显影、定影。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 14.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 EI 处理大鼠胚胎神经干细胞后细胞增殖抑制率和凋亡率的测定 与 N 组比较, F 组各项指标无明显差异, EI 组细胞增殖的抑制率、细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$), EI 组明显上调 Caspase-3 的表达量($P < 0.05$)。见图 1~3。

2.2 不同浓度 EI 处理下的大鼠胚胎神经干细胞的增殖抑制率和凋亡率的比较 EI 组内 3 个浓度之间比较, 细胞增殖的抑制率($F = 30.54, P < 0.01$)、

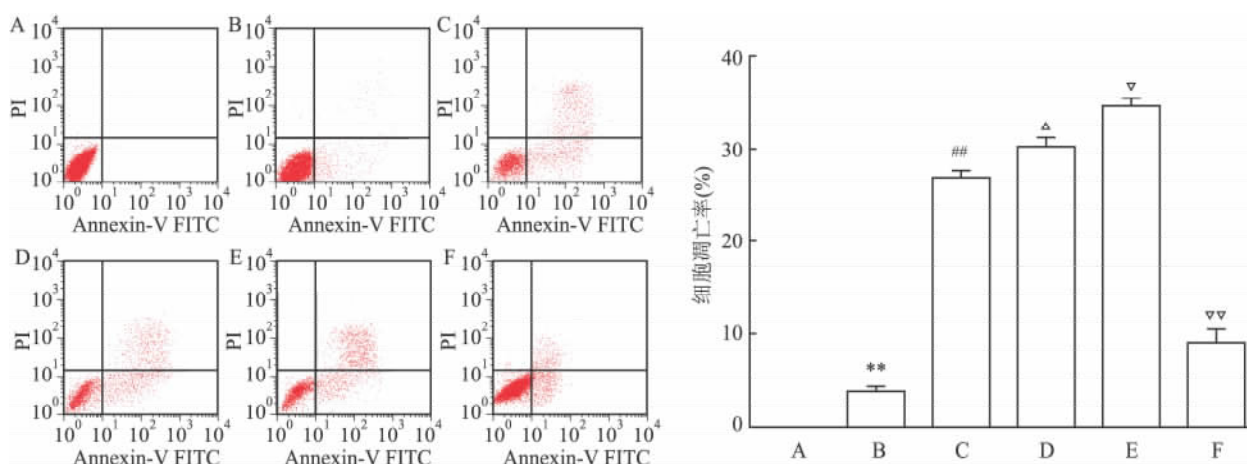


图1 流式细胞术检测细胞凋亡率

A: N组; B: F组; C: EI 8.12 mmol/L组; D: EI 9.80 mmol/L组; E: EI 12.04 mmol/L组; F: EISP组; 与N组比较: ** $P < 0.01$; 与F组比较: ## $P < 0.01$; 与EI 8.12 mmol/L组比较: $\Delta P < 0.05$; 与EI 9.80 mmol/L组比较: $\nabla P < 0.05$, $\nabla\nabla P < 0.01$

细胞的凋亡率 ($F = 23.47, P < 0.05$) 以及 Caspase-3 的表达量 ($F = 6.217, P < 0.05$) 差异均有统计学意义, 具有浓度依赖性。见图1~3。

2.3 JNK 阻断剂下 EI 引起的大鼠胚胎神经干细胞的增殖抑制率和凋亡率的测定 与 EI 组比较, EISP 组细胞增殖抑制率明显下降 ($P < 0.05$), EISP 组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$), EISP 组明显下调 Caspase-3 的表达量 ($P < 0.05$)。见图1~2、4。

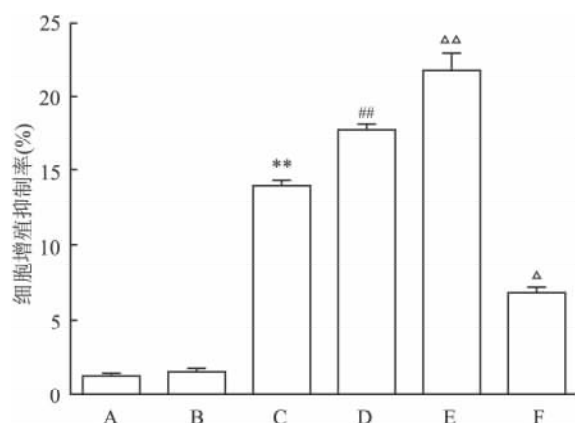


图2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

A: N组; B: F组; C: EI 8.12 mmol/L组; D: EI 9.80 mmol/L组; E: EI 12.04 mmol/L组; F: EISP组; 与N组比较: ** $P < 0.01$; 与EI 8.12 mmol/L组比较: ## $P < 0.01$; 与EI 9.80 mmol/L组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

研究^[9-11]表明, 麻醉药物的接触可能引起神经细胞死亡, 突触重塑, 甚至诱发发育中大脑形态的改变。研究^[12-13]显示, 在人类和动物的生命早期, 如

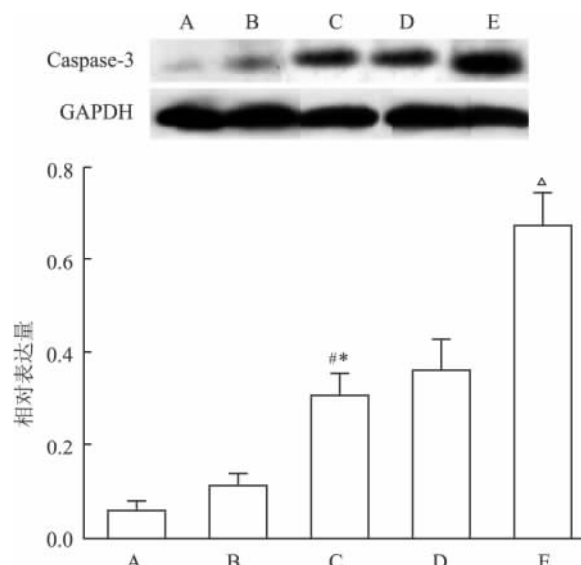


图3 Western blot 法检测不同浓度药物处理下细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达

A: N组; B: F组; C: EI 8.12 mmol/L组; D: EI 9.80 mmol/L组; E: EI 12.04 mmol/L组; 与N组比较: * $P < 0.05$; 与F组比较: # $P < 0.05$; 与EI 8.12 mmol/L组比较: $\Delta P < 0.05$

果因为手术等因素接触麻醉药物, 很有可能引发神经病理学改变、长期认知功能障碍和学习能力缺失等。然而, 每年全球范围内有大批的妊娠中期妇女由于非外科手术而不得不经全身麻醉, 即使胎盘屏障可以发挥作用, 这些胎儿发育中的大脑在手术和诊断过程中也会不可避免地接触到包括异氟烷在内的麻醉药^[14]。因此, 针对异氟烷等麻醉药物对新生儿神经毒性的研究显得非常重要。

EI 是一种已经在国内申请专利的新型麻醉药, 以30% 脂肪乳剂作为载体^[4-5]。本实验的研究对

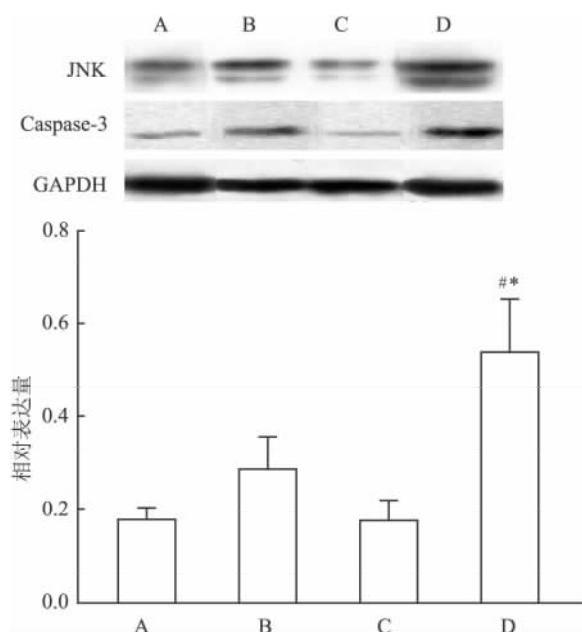


图4 Western blot 法检测 JNK 通道阻滞剂下细胞凋亡
相关蛋白 Caspase-3 的表达

A: N 组; B: F 组; C: EISP 组; D: EI 9.80 mmol/L 组; 与 N 组比较: * $P < 0.05$; 与 EISP 组比较: # $P < 0.05$

象是从妊娠 14 d 的大鼠胚胎皮层提取的胚胎神经干细胞,该细胞具有多向分化的能力,对神经系统的发育和功能维持有至关重要的作用,为下一步进行的人体胚胎神经干细胞的相关研究奠定一定的基础。预实验结果提示,所使用 EI 浓度只有在 2.8 mmol/L 以上,与正常组和脂肪乳组比较,大鼠胚胎神经干细胞的增殖抑制率才有明显差异,实验选定的 3 种 EI 浓度,换算成临床上使用吸入麻醉药的浓度,在 10 个最低肺泡有效浓度以上,因此本实验主要是对高浓度 EI 暴露引发的大鼠神经干细胞的毒性作用进行基础研究,为进一步使用临床挥发性麻醉药物对人体神经细胞进行研究提供理论依据。本研究结果显示,与正常组和脂肪乳组比较,3 个 EI 浓度组下细胞凋亡率明显上升,细胞增殖的抑制率明显上升,凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达量明显上升,3 个 EI 浓度组之间比较,随着浓度的增加,各项指标均明显上升,这些结果提示,EI 对大鼠胚胎神经干细胞的增殖有明显的抑制作用,并且这种抑制作用具有浓度依赖性,此种抑制作用是否具有时间依赖性需做进一步探讨。

药物引起的细胞凋亡和死亡大致与三大途径相关:线粒体途径、死亡受体介导的途径、内质网应激受体介导的细胞凋亡途径。研究^[15]表明,内质网应激下的未折叠蛋白反应包含有 IRE1、ATF6、PERK 3 个信号通路,其中 IRE1-JNK 在内质网应激触发的

细胞凋亡中发挥了重要作用。本实验应用 JNK 通路的特异性化学阻滞剂 SP600125,与 EI 9.80 mmol/L 组比较,EISP 组中 JNK 表达量明显下降,提示 SP600125 已经产生明显的 JNK 通路阻滞效应;与 EI 9.80 mmol/L 组比较,EISP 组中细胞凋亡率、细胞增殖抑制率、Caspase-3 蛋白表达量明显下降,提示 JNK 通路参与促进了 EI 引起的大鼠神经干细胞的增殖抑制。与 N 组和 F 组比较,EISP 组中细胞凋亡率、细胞增殖抑制率明显上升,提示可能存在 JNK 通路阻滞不全的影响,也可能 EI 引起的细胞损伤可能同时存在其它机制,需要进一步探讨。

参考文献

- [1] Istaphanous G K, Ward C G, Nan X, et al. Characterization and quantification of isoflurane-induced developmental apoptotic cell death in mouse cerebral cortex [J]. Anesth Analg, 2013, 16(4): 845-54.
- [2] Zhao X, Yang Z, Liang G, et al. Dual effects of isoflurane on proliferation, differentiation, and survival in human neuroprogenitor cells [J]. Anesthesiology, 2013, 118(3): 537-49.
- [3] Kong F J, Ma L L, Hu W W, et al. Fetal exposure to high isoflurane concentration induces postnatal memory and learning deficits in rats [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(4): 558-63.
- [4] Lv X, Wang Z M, Huang S D, et al. Emulsified isoflurane preconditioning reduces lung injury induced by hepatic ischemia/reperfusion in rats [J]. Int J Med Sci, 2011, 8(5): 353-61.
- [5] Yang X L, Ma H X, Yang Z B, et al. Comparison of minimum alveolar concentration between intravenous isoflurane lipid emulsion and inhaled isoflurane in dogs [J]. Anesthesiology, 2006, 104(3): 482-7.
- [6] Hu F, Han J, Zhai B, et al. Blocking autophagy enhances the apoptosis effect of bufalin on human hepatocellular carcinoma cells through endoplasmic reticulum stress and JNK activation [J]. Apoptosis, 2014, 19(1): 210-23.
- [7] Yuan Q, Zhao S, Wang F, et al. Palmitic acid increases apoptosis of neural stem cells via activating c-Jun N-terminal kinase [J]. Stem Cell Res, 2013, 10(2): 257-66.
- [8] 杨孟昌,陈玉培,曹德钧,等. 乳化异氟醚对乳鼠原代培养缺氧/复氧损伤心肌细胞保护效应的最适浓度研究 [J]. 四川大学学报, 2009, 40(6): 1075-7.
- [9] Zhu C, Gao J, Karlsson N, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(5): 1017-30.
- [10] Stratmann G, Sall J W, May L D, et al. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats [J]. Anesthesiology, 2009, 110(4): 834-48.

(下转第 1442 页)

exposed to PBDE-209 by gavage for 6 weeks. They were put together with healthy female mice for copulation as the ratio 1 : 2 before the end of gavage. To observe the physical development of F₁ fetal mice and the organ coefficient, testosterone levels, sperm count and testicular tissue morphology of F₁ male offspring after birth 70 (PND70) days.

Results In the high dose group, the body weight, length and anogenital distance (distance between the anus to the genitals) of F₁ fetal mice were reduced ($P < 0.05$), and the ratio of female verse male increased ($P < 0.05$); compared with the control group, the testis coefficient, epididymis coefficient, liver coefficient and kidney coefficient of the high-dose group PND70 male offspring were decreased ($P < 0.05$), and the sperm count in the tail of epididymal and serum testosterone levels were reduced significantly ($P < 0.05$); in the middle and high dose groups, the number of sperm count was reduced, the interstitial space was widened significantly, vacuolus appeared in the base compartment, and the number of sertoli cells and leydig cells was reduced in the male fetal mice by HE staining. **Conclusion** F₀ male mice exposed to PBDE-209 may affect the physical development of F₁ fetal mice, and may cause the reduction of sperm count and testosterone levels and testicular morphological change of PND70 male offspring.

Key words PBDE-209; offspring; fetal mice; PND70; testosterone; sperm count

(上接第 1347 页)

- [11] Culley D J, Baxter M G, Yukhananov R, et al. Long-term impairment of acquisition of a spatial memory task following isoflurane-nitrous oxide anesthesia in rats [J]. *Anesthesiology*, 2004, 100 (2): 309 – 14.
- [12] Wilder R T, Flick R P, Sprung J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 796 – 804.
- [13] Kalkman C J, Peelen L, Moons K G, et al. Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 805 – 12.
- [14] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (7): 519 – 29.
- [15] Kato H, Nakajima S, Saito Y, et al. mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis *via* selective activation of the IRE1-JNK pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(2): 310 – 20.

JNK contributes to the proliferation inhibition of the rat fetal neural stem cells triggered by EI

Zhou Lei, Yang Zeyong, Li Yuanhai

(Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the general anesthetic EI on the rat fetal neural stem cell proliferation (NSCs) and the role played by JNK in the influence. **Methods** The cultured rat fetal NSCs were randomly divided into 6 groups ($n = 8$ each): normal group (group N); fat milk group (group F); EI groups (including 8.12, 9.80, 12.04 mmol/L EI), 9.80 mmol/L EI group + 20 μ mol/L SP600125 group (group EISP). After incubated for 12 hours, the cellular effects of EI and cell viability were evaluated by MTT reduction assay. The apoptotic rate of the rat NSCs were determined by flow cytometry, and the expression of protein Caspase-3 was observed by Western blot.

Results There was no statistical difference in cell viability, apoptotic rate and protein expression of Caspase-3 in group N and group F. EI group had higher cell apoptotic rate ($P < 0.01$), protein expression of Caspase-3 ($P < 0.05$), but lower cell viability than group N ($P < 0.01$). And significant differences were found between three doses of EI groups ($P < 0.05$). Compared with EI group, lower cell apoptotic rate ($P < 0.01$), protein expression of Caspase-3 but higher cell viability were observed in group EISP ($P < 0.05$). **Conclusion** JNK plays an important role in EI-induced cytotoxicity possibly in a dose-dependent manner.

Key words fetal neural stem cell; emulsified isoflurane; JNK; proliferation inhibition; apoptosis