

17 β 雌二醇对丙泊酚诱导皮层神经元凋亡的影响

李建立¹, 郭洪霞¹, 梁巍², 吴红海³, 侯艳宁³

(1. 河北省人民医院麻醉科, 石家庄 河北 050051; 2. 河北省人民医院普外科, 石家庄 河北 050051;
3. 白求恩国际和平医院药剂科, 石家庄 河北 050082)

【摘要】 目的 探讨 17 β 雌二醇对丙泊酚诱导原代培养皮层神经元凋亡的影响及机制。**方法** 原代培养 7 d 的大鼠皮层神经元, 随机分为三组: 溶剂对照组 (给予等溶剂 20% 脂肪乳), 丙泊酚组 (丙泊酚终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$), 17 β 雌二醇 + 丙泊酚组 (17 β 雌二醇终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 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 Hoechst 33258 核染色法和 TUNEL 法检测皮层神经元凋亡, Western-blot 法测定神经元 Bcl-2, Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白的水平。**结果** 与溶剂对照组比较, 丙泊酚组神经元凋亡率显著性增加 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白水平显著性下降 ($P < 0.01$), Bax 蛋白水平显著性增加 ($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 显著性降低 ($P < 0.01$), cleaved caspase-3 蛋白水平显著性增加 ($P < 0.01$)。与丙泊酚组比较, 17 β 雌二醇 + 丙泊酚组神经元凋亡率显著性下降 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白水平显著性增加 ($P < 0.01$), Bax 蛋白水平显著性下降 ($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 显著性增加 ($P < 0.01$), cleaved caspase-3 蛋白水平显著性下降 ($P < 0.01$)。**结论** 17 β 雌二醇可通过影响 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平抑制皮层神经元凋亡, 产生保护作用。

【关键词】 丙泊酚; 17 β 雌二醇; 原代培养皮层神经元; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0032-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.007

Effects of 17 β -estradiol on propofol-induced rat cortical neuroapoptosis

LI Jian-li¹, GUO Hong-xia¹, LIANG Wei², WU Hong-hai³, HOU Yan-ning³,

(1. Department of Anesthesiology, 2. Department of General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China.
3. Department of Pharmacy, Bethune International Peace Hospital of Chinese PLA, Shijiazhuang 050082)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects and the mechanisms of 17 β -estradiol on the propofol-induced neuroapoptosis in primary cultured rat cortical neurons. **Methods** The neurons were cultured for 7 days and then divided into three groups: vehicle-control group (treated with equal volume of 20% intralipid), propofol-treated group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ propofol), and propofol plus 17 β -estradiol treated group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ propofol and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17 β -estradiol). 12 hours after the treatment, neuroapoptosis was detected by Hoechst 33258 staining and TUNEL assay, and the levels of Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with the vehicle-control group, the neuroapoptosis increased greatly ($P < 0.01$), Bcl-2 level reduced ($P < 0.01$), Bax and cleaved caspase-3 levels increased greatly ($P < 0.01$), and Bcl-2/Bax ratio reduced significantly ($P < 0.01$). Compared with the propofol-treatment group, the neuroapoptosis decreased greatly ($P < 0.01$), Bcl-2 level increased ($P < 0.01$), Bax and cleaved caspase-3 levels reduced greatly ($P < 0.01$), and Bcl-2/Bax ratio increased

[基金项目] 2014 年河北省卫生厅指令性课题 (编号: ZL20140095)。

[作者简介] 李建立 (1976 -), 男, 博士, 从事麻醉药理学研究。E-mail: hbljianli@163.com。

[通讯作者] 侯艳宁, 女, 教授, 主要从事神经药理学研究。E-mail: biph2011@163.com。

greatly ($P < 0.01$). **Conclusions** 17β -estradiol can protect cortical neurons against propofol-induced cortical neuroapoptosis by regulating the expression of Bcl-2 and Bax.

【Key words】 Propofol; 17β -estradiol; Primary cultured cortical neurons; Apoptosis; Rat

丙泊酚作为常用的静脉全身麻醉药,通过激动 GABA 受体和抑制 NMDA 受体发挥麻醉作用,具有起效快、苏醒快、不良反应少等优点,广泛用于麻醉诱导和维持。丙泊酚是否适用于新生儿和婴幼儿的全身麻醉,目前观点不一。研究表明 GABA 受体在发育期大脑作为一种兴奋性神经递质,激动 GABA 受体引起氯离子外流使细胞膜去极化,产生兴奋性神经毒性^[1]。最近动物实验研究表明,反复大剂量使用丙泊酚可对发育期动物大脑产生损伤,导致发育期动物大脑广泛脑区神经细胞凋亡的显著增加,甚至影响动物成年后的学习记忆功能^[2,3]。体外细胞实验研究也表明丙泊酚具有发育期神经毒性,可诱导原代培养神经元凋亡^[4,5]。丙泊酚发育期神经毒性引起了众多学者的广泛关注,因此研究丙泊酚发育期神经毒性的发生机制以及寻找安全有效的措施防治丙泊酚发育期神经毒性已成为麻醉医师关注的重要课题。以往研究表明 17β 雌二醇作为一种内源性神经甾体可对 GABA 受体激动剂苯巴比妥和 NMDA 受体抑制剂 MK-801 和氯胺酮产生的发育期大鼠大脑损伤产生保护作用^[6-8]。 17β 雌二醇是否对丙泊酚诱导的原代培养皮层神经元凋亡产生保护作用以及机制尚不清楚,本实验将从凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 cleaved caspase-3 水平变化等方面研究 17β 雌二醇抑制丙泊酚诱导原代培养皮质神经元凋亡的机制,以期为临床应用 17β 雌二醇防治丙泊酚的发育期神经毒性提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

丙泊酚 (Diprivan, 意大利 AstraZeneca 公司,批号:KW814), 20% 脂肪乳购自广州百特公司, DMEM 培养液、胎牛血清、Neurobasal 培养液、B27 促生长剂购自美国 Gibco 公司, 17β 雌二醇、DMSO 购自美国 Sigma 公司, Hoechst 33258 和胰蛋白酶购自北京索来宝公司, TUNEL 试剂盒购自德国 Mannheim 公司, Bcl-2、Bax 及 cleaved caspase-3 抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 皮层神经元原代培养:取新生 24 h 内的 SD

大鼠(清洁级, 体质量 5 ~ 6 g, 雌雄不限, 河北省实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(冀) 2008-1003) 大脑额叶皮层组织, 用冷 PBS 洗剂, 剪碎, 移入 0.125% 胰蛋白酶中置于 37℃ 水浴锅内充分消化 15 min, 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 1×10^9 /L 的密度接种于经多聚赖氨酸处理的培养板中, 放于 5% CO_2 培养箱 37℃ 恒温培养 24 h 后, 全量换 Neurobasal + B27 培养基, 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。

1.2.2 实验分组:原代培养 7 d 的大鼠皮层神经元, 随机分为 3 组:溶剂对照组(给予等溶剂 20% 脂肪乳), 丙泊酚组(丙泊酚终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$), 17β 雌二醇 + 丙泊酚组(17β 雌二醇终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 17β 雌二醇加入 2 h 后, 给予丙泊酚, 其终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2.3 Hoechst 33258 核染色法检测神经元凋亡:将神经元接种于 6 孔培养板中, 按上述分组方法给予不同药物处理后, 移去培养液, 用 4℃ PBS 冲洗 3 遍后, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 去除多聚甲醛固定液, 用冷 PBS 液冲洗 3 遍, 加入 Hoechst 33258 染色 8 min, PBS 漂洗 3 遍, 荧光显微镜下随机选取 5 个视野进行形态学观察和计数, 计算凋亡率。凋亡率(%) = 凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 应用 TUNEL 法检测神经元凋亡:应用 TUNEL 法检测神经元凋亡 将细胞涂片用 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 然后 PBS 洗 3 次, 0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 30 min, 然后在 0.1% Triton X-100 的 0.1% 柠檬酸钠溶液中 4℃ 孵育 5 min, 将 50 μL TUNEL 反应液在 37℃ 湿盒中反应 60 min, PBS 冲洗 3 次, 然后再加入 50 μL 可转变还原氧化酶反应液, 37℃ 湿盒中孵育 30 min, 最后加入 50 μL 底物反应液室温反应 10 min。光镜下观察神经元, 细胞核有棕黄色颗粒者为阳性神经元, 采取 5 个不同的视野, 计算阳性和阴性细胞数量。

1.2.5 Western blot 法测定 Bcl-2、Bax 及 cleaved caspase-3 蛋白水平:细胞经各种处理后, 收集细胞, 用细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 用 BCA 法检

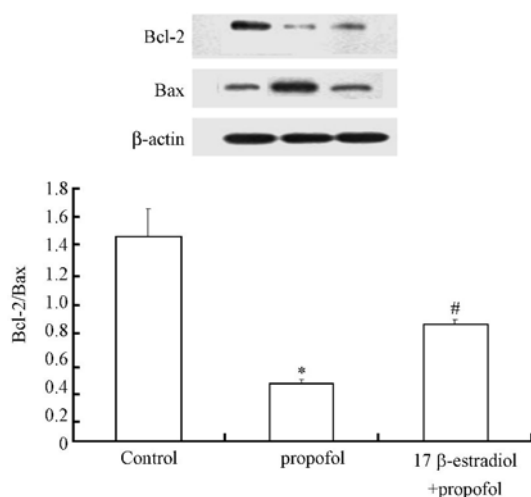
测蛋白含量。取待测蛋白质 50 μg 加上样缓冲液煮沸变性,于 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中 100 V 电泳 1.5 h, 转膜 2 h, 加入 Bcl-2, Bax 及 cleaved caspase-3 抗体(1:2 000), 4℃ 过夜, 常规洗涤, 加羊抗鼠二抗(1:5 000), 37℃ 孵育 60 min, 洗涤, 电化学法发光, 显影, 扫描, 用凝胶图像处理系统分析目标条带与内参照条带吸光度的比值。实验重复 3 次, 设 β -actin 蛋白为内参。

1.2.6 统计学方法:数据应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,数据均用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ s)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用单因素方差分析和 SNK 检验进行数据分析。

2 结果

2.1 Hoechst 33258 荧光染色法检测 17 β 雌二醇对丙泊酚诱导皮层神经元凋亡的影响

Hoechst 33258 荧光染色法检测皮层神经元凋亡,结果表明溶剂对照组有少量的凋亡细胞呈亮蓝色,凋亡率为(6.7 $\pm$ 0.6)%。与溶剂对照组比较,丙泊酚组神经元凋亡显著性增加($P < 0.01$),大多细胞呈亮蓝色,部分细胞核呈碎片状,部分染色质边集,凋亡率为(43.4 $\pm$ 4.9)%。与丙泊酚组比较,17 β 雌二醇 + 丙泊酚组神经元凋亡显著性降低($P < 0.01$),凋亡率为(22.1 $\pm$ 2.6)%。图 1,见彩插 2)。



注:与对照组比较, * $P < 0.01$; 与丙泊酚组比较, # $P < 0.01$

图 3 不同处理对皮层神经元 Bcl-2/Bax 的影响注

Note. Compared with the control group, * $P < 0.01$;

Compared with the propofol group, # $P < 0.01$

Fig.3 Effect of different treatments on Bcl-2/Bax in the cortical neurons

2.2 TUNEL 法检测 17 β 雌二醇对丙泊酚诱导皮层神经元凋亡的影响

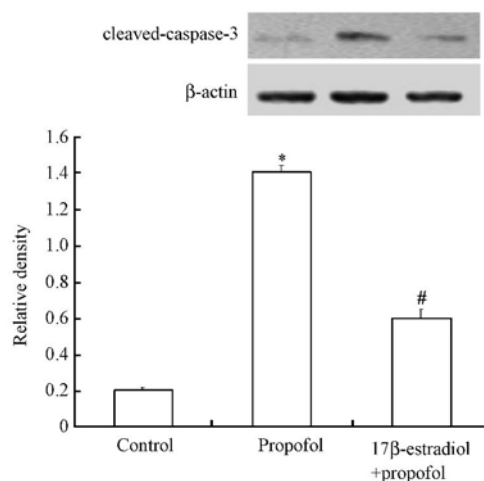
TUNEL 法检测结果显示:与溶剂对照组(7.1 $\pm$ 0.7)% 比较,丙泊酚组神经元凋亡率(46.2 $\pm$ 5.6)% 显著性增加($P < 0.01$),与丙泊酚组比较,17 β 雌二醇 + 丙泊酚组神经元凋亡率(19.9 $\pm$ 3.1)% 显著性降低($P < 0.01$)(图 2,见彩插 2)。

2.3 不同处理对皮层神经元 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平的影响

与溶剂对照组比较,丙泊酚组 Bcl-2 蛋白水平显著性下降($P < 0.01$),Bax 蛋白水平显著性增加($P < 0.01$),Bcl-2/Bax 显著性降低($P < 0.01$)。与丙泊酚组比较,17 β 雌二醇 + 丙泊酚组 Bcl-2 蛋白水平显著性增加($P < 0.01$),Bax 蛋白水平显著性下降($P < 0.01$),Bcl-2/Bax 显著性增加($P < 0.01$)(图 3)。

2.4 不同处理对皮层神经元 cleaved caspase-3 蛋白水平的影响

与溶剂对照组比较,丙泊酚组 cleaved caspase-3 蛋白水平显著性增加($P < 0.01$)。与丙泊酚组比较,17 β 雌二醇 + 丙泊酚组 cleaved caspase-3 蛋白水平显著性下降($P < 0.01$)。见图 4。



注:与对照组比较, * $P < 0.01$;

与丙泊酚组比较, # $P < 0.01$

图 4 不同处理对皮层神经元

cleaved caspase-3 蛋白水平的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.01$;

Compared with the propofol group, # $P < 0.01$

Fig.4 Effect of different treatments on cleaved caspase-3 in the cortical neurons

3 讨论

全世界每年有数百万儿童由于各种原因需要在全身麻醉下接受手术。丙泊酚作为常用的全身麻醉药,虽然药典显示丙泊酚慎用于 3 岁以下的患儿,但在实际临床工作中,丙泊酚被广泛应用于婴幼儿。丙泊酚是否适用于新生儿和婴幼儿的全身麻醉,目前观点不一。近年来动物和体外细胞研究均表明丙泊酚具有发育期神经毒性,可引起原代培养皮层神经元凋亡和发育期动物大脑神经细胞的大量凋亡并影响动物成年后的学习记忆功能^[2-5]。因此丙泊酚在婴幼儿麻醉中的应用引起了学者的广泛关注。针对麻醉药的发育期神经毒性,美国国立卫生研究院、食品药品监督管理局以及国际麻醉研究学会要求研究者寻找有效的措施来防治麻醉药所引起发育期大脑损伤。

有关防治丙泊酚引起的发育期大脑损伤的措施近年来进行了一些研究,有研究发现右美托咪定、乙酰左旋肉碱、锂剂等可对丙泊酚引起的发育期大脑损伤产生保护作用^[9-11]。神经甾体由脑组织经胆固醇在各种酶的作用下合成的甾类化合物,被称为第四类神经递质,对中枢神经系统的发育和成熟具有重要的影响^[12]。17 β 雌二醇作为一类神经甾体近年来众多学者对其神经保护作用进行了大量的研究,可对多种因素引起的发育期大脑损伤产生保护作用^[6-8,13,14]。但 17 β 雌二醇是否对丙泊酚诱导的原代培养皮层神经元凋亡产生保护作用以及机制,未见报道,本文对此进行了研究。

目前研究认为凋亡是丙泊酚引起发育期大脑损伤的主要机制^[15]。荧光显微镜检测法因结果可靠,易于操作而成为检测细胞凋亡的常用手段,尤其适用于体外培养细胞。Hoechst 33258 是一种细胞膜通透性的常见荧光染料,是用于检测细胞凋亡的经典方法。正常细胞核呈圆形,淡蓝色,而凋亡的细胞核呈碎片状,边集的结构特征,由于浓集而使染色增强,荧光更为明亮,呈亮蓝色。本研究采用 Hoechst 33258 染色来观察凋亡的神经元,发现丙泊酚导致神经元凋亡的明显增加,而 17 β 雌二醇处理后会使得神经元凋亡明显减少。TUNEL 法也称 DNA 断裂的原位末端标记法,这一方法能对 DNA 分子断裂缺口中的 3'-OH 进行原位标记,借助一种可观测的标记物,对凋亡细胞核 DNA 中产生的 3'-OH 末端进行原位标记,在 DAB 的存在下,产生很

强的颜色反应(呈深棕色),用显微镜即可进行观察,此方法也是用于检测细胞凋亡的经典方法。本实验 TUNEL 结果进一步证实 17 β 雌二醇可抑制丙泊酚诱导的皮层神经元凋亡。

凋亡发生受促凋亡和抗凋亡两类蛋白的控制。研究表明抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 蛋白水平高低与凋亡发生密切相关,凋亡的发生由二者的比率决定^[16,17]。Caspase-3 作为凋亡发生的最终执行者,Bcl-2 通过抑制线粒体细胞色素 C 以及 caspase-3 的活化产生抗凋亡作用^[18]。Bax 作为线粒体膜上离子通道的重要组成部分,引起细胞色素 C 的大量释放,激活 caspase-9,进一步激活 caspase-3,最终引起细胞凋亡^[19]。以往研究表明丙泊酚诱导原代培养海马神经元凋亡与丙泊酚下调 Bcl-2 蛋白水平,增加 cleaved caspase-3 蛋白水平有关^[3]。本研究结果显示丙泊酚诱导皮层神经元凋亡时伴随 Bcl-2 蛋白水平的显著下降,Bax 蛋白水平的显著增加,导致 Bcl-2/Bax 比值显著降低,引起 cleaved caspase-3 蛋白水平的显著增加。本实验前期研究表明 17 β 雌二醇可通过上调 Bcl-2 蛋白水平,下调 cleaved caspase-3 蛋白水平,抑制麻醉药氯胺酮诱导的皮层神经元凋亡^[7]。本研究结果表明 17 β 雌二醇预处理抑制了丙泊酚引起的 Bcl-2 蛋白水平的下降和 Bax 蛋白水平的显著增加,使 Bcl-2/Bax 比值显著增加,进而使 cleaved caspase-3 蛋白水平显著下降,抑制了丙泊酚诱导的皮层神经元凋亡。以上结果充分表明 17 β 雌二醇抑制丙泊酚诱导的原代培养皮层元凋亡可能与下调 Bax、cleaved caspase-3 和上调 Bcl-2 的蛋白表达,升高 Bcl-2/Bax 比值有关,但 17 β 雌二醇对其他凋亡相关蛋白是否也有作用以及相关机制,还需要进一步探讨。

总之 17 β 雌二醇具有保护原代培养皮层神经元免受丙泊酚损伤的作用,其机制是通过抗凋亡作用实现的。本研究为围术期应用 17 β 雌二醇预防麻醉药对婴幼儿大脑产生神经损伤提供了初步的实验依据。

参考文献:

- [1] Hudson AE, Hemmings HC Jr. Are anaesthetics toxic to the brain? [J]. Br J Anaesth, 2011, 107(1): 730-737.
- [2] Huang J, Jing S, Chen X, et al. Propofol administration during early postnatal life suppresses hippocampal neurogenesis [J]. Mol Neurobiol, 2015, PMID: 25577171.
- [3] Karen T, Schlager GW, 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.
- [4] 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): 720–729.
- [5] 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): 680–688.
- [6] Asimiadou S, Bittigau P, Felderhoff-Mueser UD, et al. Protection with Estradiol in developmental models of apoptotic neurodegeneration[J]. *Ann Neurol*, 2005, 58(2): 266–276.
- [7] Li J, Wang B, Wu H, et al. 17 β -estradiol attenuates ketamine-induced neuroapoptosis and persistent cognitive deficits in the developing brain [J]. *Brain Res*, 2014, 1593: 30–39.
- [8] Li J, Wu H, Xue G, et al. 17 β -oestradiol protects primary cultured rat cortical neurons from ketamine-induced apoptosis by activating PI3K/Akt/Bcl-2 signaling [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 113(6): 411–418.
- [9] Li J, Xiong M, Nadavaluru PR, et al. Dexmedetomidine attenuates neurotoxicity induced by prenatal propofol exposure [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2015, PMID: 25844953
- [10] Liu F, Rainosek SW, Sadovova N, et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on propofol-induced toxicity in embryonic neural stem cells [J]. *Neurotoxicology*, 2014, 42: 49–57.
- [11] Straiko MM, Young C, Cattano D, et al. Lithium protects against anesthesia-induced developmental neuroapoptosis [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 862–868.
- [12] Kawato S, Yamada M, Kimoto T. Brain neurosteroids are 4th generation neuromessengers in the brain: cell biophysical analysis of steroid signal transduction [J]. *Adv Biophys*, 2001, 37(1): 1–48.
- [13] Lu LX, Yon JH, Carter LB, et al. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(9): 1603–1615.
- [14] Ramezani A, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, et al. Neuroprotective effects of the 17 β -estradiol against ethanol-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological and behavioral changes [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 100(1): 144–151.
- [15] Zou W, Xiao H, Gu M, et al. Propofol induces rat embryonic neural stem cell apoptosis by activating both extrinsic and intrinsic pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4): 1123–1128.
- [16] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis [J]. *Jpn Heart J*, 2001, 42(6): 759–770.
- [17] McClintock DS, Santore MT, Lee VY, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(1): 94–104.
- [18] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590–8607.
- [19] Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(3): 303–312.

[修回日期] 2015 – 10 – 17