

丙泊酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其 Caspase-3 表达干预机制的研究

乔霖¹, 赵薇¹, 王新生², 邢珍²

1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000

摘要: 目的 通过观察 ip 丙泊酚对脑缺血再灌注大鼠海马区神经细胞的影响, 探讨丙泊酚对临床围手术期预防脑缺血再灌注损伤的作用。方法 SD 大鼠 60 只随机分为丙泊酚组、假手术组和模型组。采用大脑中动脉线栓法制作左侧大脑动脉栓塞模型。在缺血再灌注前 10 min 时, 丙泊酚组 ip 丙泊酚 50 mg/kg, 模型组 ip 给予等量生理盐水。假手术组只进行颈部切开、缝合操作而不进行缺血再灌注实验。缺血再灌注 24 h 采集脑组织。TTC 染色法测定大鼠左侧脑组织梗死面积, 免疫组化检测大鼠脑组织海马区 Caspase-3 的表达, 原位杂交检测大鼠海马组织 Caspase-3 mRNA 的转录水平。结果 与模型组比较, 丙泊酚组脑组织灰白色区域明显缩小, 改善了脑组织梗死面积, 海马区 Caspase-3 的阳性表达和 Caspase-3 mRNA 的转录水平明显降低 ($P < 0.01$)。结论 丙泊酚干预对大鼠脑缺血再灌注损伤有保护作用, 其机制可能通过干预 Caspase-3 相关的细胞凋亡信号传导途径来完成。

关键词: 丙泊酚; 脑缺血再灌注; Caspase-3; 凋亡

中图分类号: R965; R972 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)06-0629-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.06.005

Protection of propofol on cerebral ischemia reperfusion injury in rats and its mechanism of intervention for Caspase-3

QIAO Lin¹, ZHAO Wei¹, WANG Xin-sheng², XING Zhen²

1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Objective To observe the effects of propofol ip injection on hippocampus nervous after cerebral ischemia-reperfusion injury, to study the prevention of propofol to cerebral ischemia-reperfusion injury during clinical peroperative period. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into propofol group, Sham group, and model group. Left cerebral arterial embolism models were made. At 10 min before cerebral ischemia-reperfusion, rats in propofol group were ip administered propofol (50 mg/kg), and physiological saline was given to Sham group. Rats in model group were done the same operation except cerebral ischemia-reperfusion and propofol. At 24 h after ischemia reperfusion, the tissues were collected. The areas of left cerebral infarct of rats were measured by TTC staining method, Caspase-3 express in hippocampus was measured by immunohistochemical methods, and transcriptional levels of Caspase-3 mRNA were detected by in situ hybridization test. **Results** Compared with model group, gray area obviously shrank and incanus areas were improved in propofol group. The expression of Caspase-3 and transcriptional levels of Caspase-3 mRNA in hippocampus of rats in propofol group were lower than those in model group, with significant differences between two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Propofol intervention before ischemia-reperfusion maybe prevent ischemia reperfusion injury, and the mechanism is related to the apoptosis signal transduction pathway through Caspase-3 mediation.

Key words: propofol; cerebral ischemia-reperfusion; Caspase-3; apoptosis

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2012405016); 河北北方学院自然科学研究计划项目 (120176)

作者简介: 乔霖, 男, 硕士研究生, 研究方向为静脉麻醉药与认知功能障碍。Tel: 15350739781 E-mail: 593998360@qq.com

*通信作者 邢珍, 女, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为麻醉与脑保护。

临床围手术期脑缺血再灌注可引起缺血周围脑组织迟发性神经细胞凋亡, Caspase-3 在其中起着重要的作用。及时有效地干预措施对脑缺血再灌注的损伤修复具有重要的意义。丙泊酚是临床常用麻醉药, 由于其能够显著降低脑组织的代谢, 从而可能对脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[1]。本实验通过观察丙泊酚对脑缺血再灌注大鼠海马区神经细胞的作用, 探讨丙泊酚对临床围手术期预防脑缺血再灌注损伤的影响。

1 材料

成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 200~250 g, 购于河北北方学院实验动物中心, 动物使用许可证号 SYXK (冀) 2014-0062。

丙泊酚注射液, 规格 10 mL:100 mg, 批号 X141217-1, 广东嘉博制药有限公司。2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TCC), 南京探求生物技术有限公司。兔抗鼠 Caspase-3 (批号 bs-6105R)、羊抗兔 IgG (批号 BA1039)、SABC 即用型试剂盒、Caspase-3 原位杂交检测试剂均购自武汉博士德生物有限公司。

2 实验方法

2.1 脑缺血再灌注模型制备和分组

SD 大鼠 60 只随机分为丙泊酚组、假手术组和模型组, 每组 20 只。丙泊酚组和模型组参照 Longa 等^[2]制备左侧大脑动脉栓塞模型: ip 10%水合氯醛 (0.33 mL/100 g) 麻醉, 行左侧颈正中切口, 暴露颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。于颈总动脉分叉上方 2 mm 处线栓颈内动脉, 缺血 2 h 后拔掉线栓, 即得局灶性脑缺血再灌注损伤模型。在缺血再灌注前 10 min 时, 丙泊酚组 ip 丙泊酚 50 mg/kg, 模型组 ip 给予等量生理盐水。假手术组只进行颈部切开、缝合操作而不进行缺血再灌注实验。

缺血再灌注 24 h 后, 丙泊酚组和模型组各随机取 10 只模型大鼠、假手术组随机取 5 只大鼠进行 TCC 测定。其余大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉, 4%多聚甲醛灌注固定, 采取脑组织 4%多聚甲醛浸泡固定、脱水、包埋、制片, 备用。

2.2 TTC 染色法测定脑组织梗死面积

将脑组织分成 4 片, 置于 1% TCC 磷酸缓冲液中, 37 °C 避光孵育 30 min, 正常组织染成红色, 缺血组织染成白色, 脑切片用 Image-Pro plus 6.0 软件进行梗死面积的测量, 计算脑梗死体积百分比 (BIVP)。

BIVP=缺血部分质量/全脑质量

2.3 免疫组化技术观察海马区 Caspase-3 的表达

切片脱蜡至水, 2%双氧水灭活内源性酶, 枸橼酸缓冲液热修复, BSA 封闭, 滴加兔抗鼠 Caspase-3 抗体, 4 °C 过夜。滴加生物素化羊抗兔 IgG, 滴加 SABC, DAB 显色, 苏木素复染, 光学显微镜观察, 每例标本选取 10 张切片使用真彩病理图文分析系统采集阳性结果的吸光度值, 计算平均值, 作为该例标本的 Caspase-3 的表达。

2.4 原位杂交检测海马组织 Caspase-3 mRNA 转录水平

切片脱蜡至水, 2%双氧水室温灭活内源性酶, 滴加 3%柠檬酸钠新鲜稀释的胃蛋白酶, 室温消化 30 min, 暴露 mRNA 片段。滴加 20 μL 预杂交液, 42 °C 恒温箱 4 h 预杂交。滴加 20 μL 杂交液, 恒温箱 42 °C 过夜杂交, 洗涤后滴加封闭液, 滴加生物素化鼠抗地高辛、SABC, DAB 显色。光学显微镜观察, 每例标本选取 10 张切片, 使用真彩病理图文分析系统采集阳性结果的吸光度值, 计算平均值, 作为该例标本的 Caspase-3 的 mRNA 的转录水平。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行独立样本 *t* 检验。

3 结果

3.1 丙泊酚对脑组织梗死面积的影响

TCC 结果显示: 模型组左侧脑片可见大小不等的灰白色区域, 假手术组整个脑片无白色区域, 表明脑供血良好, 丙泊酚组与模型组脑组织比较灰白色区域明显缩小, 见图 1。



图 1 TTC 染色结果

Fig. 1 Results of TS staining

梗死面积测量结果显示模型组与假手术组比较, 差异具有显著性 ($P < 0.01$), 提示模型组造模成功。丙泊酚组与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$), 表明丙泊酚改善了脑组织梗死, 见表 1。

3.2 丙泊酚对海马区 Caspase-3 表达的影响

免疫组化结果显示: 模型组、假手术组和丙泊酚组海马区 Caspase-3 均有一定表达, 光镜下阳性染色呈黄褐色, 见图 2。

表1 BIVP、免疫组化和原位杂交实验图像分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 1 Results in BIVP, immunohistochemistry, and insitu hybridization image ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BIVP/%	Caspase-3	Caspase-3 mRNA
假手术	—	0.00±0.00	4.8±1.7	5.1±1.9
模型	—	38.14±6.43 [*]	18.3±4.1 [*]	18.8±3.2 [*]
丙泊酚	50	33.35±7.94 [#]	12.4±3.3 [#]	14.6±4.3 [#]

与假手术组比较: ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ vs model group

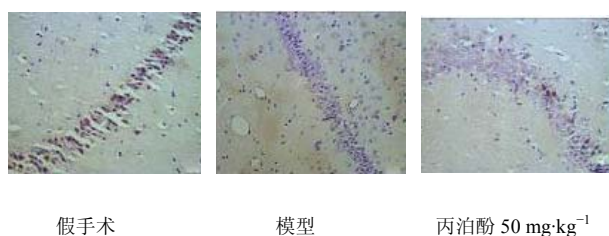


图2 海马区 caspase-3 的表达

Fig. 2 Expression of Caspase-3 in hippocampus

图像分析结果显示: 模型组海马区 Caspase-3 的阳性表达比假手术组明显增多, 丙泊酚组海马区 Caspase-3 的表达比模型组明显减少, 但明显高于假手术组 ($P<0.01$), 见表1。

3.3 丙泊酚对海马区 Caspase-3 mRNA 转录水平的影响

原位杂交结果显示: 模型组、假手术组和丙泊酚组海马区均有 Caspase-3 mRNA 转录, 光镜下阳性染色呈黄褐色, 见图3。

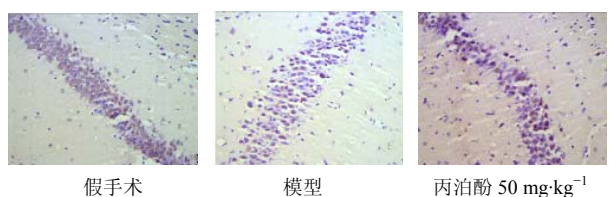


图3 海马区 caspase-3 mRNA 转录

Fig. 3 Caspase-3 mRNA transcription in hippocampus

图像分析结果显示: 假手术组海马区 Caspase-3 mRNA 转录水平比模型组明显上调, 丙泊酚组海马区 Caspase-3 mRNA 转录水平比假手术组明显下调, 但高于模型组 ($P<0.01$), 见表1。

4 讨论

丙泊酚作为临床上应用最为广泛的镇静药物之一, 其临床特点是起效迅速, 无明显蓄积, 苏醒快而完全。但是大剂量的丙泊酚可以导致呼吸、循环

的抑制, 从而导致患者死亡, 而较小剂量的丙泊酚又起不到麻醉作用, 笔者通过预实验及相关文献确定大鼠腹腔注射的剂量为 50 mg/kg, 麻醉期间大鼠无身体活动以及缺氧表现。

脑缺血再灌注损伤是脑缺血一定时间后恢复血液供应, 但脑功能却出现更加严重的功能障碍^[3], 其中包含酸中毒、释放兴奋性神经递质、氧自由基损伤、血管通透性改变以及激活凋亡基因等。脑缺血的即刻, 缺血中心发生缺血坏死, 而缺血周围发生细胞凋亡^[4]。Caspase-3 是参与凋亡级联反应的最终因子, 在凋亡的发生中起着关键作用, 其凋亡通路主要是经线粒体介导的细胞凋亡通路和死亡受体 (TNF α R1、FAS) 介导的凋亡通路, 两条不同的途径分别由 Caspase-9 或 Caspase-8 激活变为异二聚体形式^[5]。研究表明, 减少细胞凋亡对脑缺血再灌注损伤有保护作用, 可以降低脑缺血再灌注引发的迟发性神经细胞死亡^[6]。

丙泊酚主要通过降低谷氨酸及增强 GABA 的表达产生中枢麻醉作用。研究表明低剂量的丙泊酚预处理可以下调局部脑缺血再灌注引起的炎症因子的表达^[7]。Basu 等^[8]研究显示丙泊酚可以缓解中枢氧化应激的损伤。潘炳德等^[9]研究表明丙泊酚通过抑制 NF- κ B 活化引起的 PUMA 上调, 而后者可以下调 Caspase-3 和上调 Bcl-2 的活性, 从而抑制神经组织细胞凋亡。Zhao 等^[10]认为丙泊酚可以通过上调成纤维细胞生长因子的表达, 从而对缺血脑组织的损伤起到保护作用。Xi 等^[11]研究认为丙泊酚可以通过调节 Bcl-2 的表达下调缺血再灌注后的脑组织细胞凋亡, 辛险峰等^[12]的研究也表明, 丙泊酚可以抑制 Caspase-3 的活性而达到脑保护的作用。实验结果显示: 大脑中动脉栓塞 2 h 后再灌注可引发同侧大脑局灶性梗死, 海马区 Caspase-3 在基因转录水平和表达水平均上调; 而在再灌注前 10 min 给予丙泊酚腹腔注射, 出现大脑局灶性梗死区域减小, 海

马区 Caspase-3 在基因转录水平和表达水平均较未给予丙泊酚的减少。

结果提示大脑缺血再灌注前进行丙泊酚干预可能对大脑缺血再灌注的损伤有保护作用,其机制可能通过干预 Caspase-3 相关的细胞凋亡信号传导途径来完成。但其详细机制尚需深入研究,以期的大脑缺血再灌注损伤的保护提供更多的方式,并同时为麻醉药物的选用与临床心脏手术中减少脑缺血再灌注损伤等的关系研究拓展思路。

参考文献

- [1] Nakajima A, Tsuji M, Inagaki M, *et al.* Neuroprotective effects of propofol on ER stress-mediated apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 725: 47-54.
- [2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] Love S. Apoptosis and brain ischaemia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(2): 267-282.
- [4] 崔芳芹, 杨卫东, 陈前芬, 等. 不同时间脑缺血再灌注损伤小鼠大脑 Bcl-2 和 Caspase-3 表达的变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(10): 2765-2767.
- [5] Zhang X, Ha T, Lu C, *et al.* Poly (I:C) therapy decreases cerebral ischaemia/reperfusion injury via TLR3-mediated prevention of Fas/FADD interaction [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 555-565.
- [6] Burguillos M A, Dejerborg T, Kavanagh E, *et al.* Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity [J]. *Nature*, 2011, 472(7343): 319-324.
- [7] Zhou R, Yang Z, Tang X, *et al.* Propofol protects against focal cerebral ischemia via inhibition of microglia-mediated proinflammatory cytokines in a rat model of experimental stroke [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82729.
- [8] Basu S, Miculescu A, Sharma H, *et al.* Propofol mitigates systemic oxidative injury during experimental cardiopulmonary cerebral resuscitation [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011, 84(5/6): 123-130.
- [9] 潘炳德, 宋彩霞, 杨堂斗, 等. 丙泊酚对大鼠局灶性脑缺血-再灌注时 NF- κ B 活化和 PUMA 表达的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2011, 27(2): 185-188.
- [10] Zhao X C, Zhang L M, Tong D Y, *et al.* Propofol increases expression of basic fibroblast growth factor after transient cerebral ischemia in rats [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(3): 530-537.
- [11] Xi H J, Zhang T H, Tao T, *et al.* Propofol improved neurobehavioral outcome of cerebral ischemia-reperfusion rats by regulating Bcl-2 and Bax expression [J]. *Brain Res*, 2011, 1410: 24-32.
- [12] 辛险峰, 王进全, 左会明, 等. 丙泊酚对脑缺血再灌注时 Caspase-3 和相关因子的影响 [J]. *黑龙江医药科学*, 2010, 33(4): 34-35.