

• 论著 •

丙泊酚联合利血平对再灌注损伤 PC12 细胞保护作用的研究

曹江北 王恒林 李云峰 米卫东

【摘要】 目的 观察丙泊酚与利血平单用或合用对缺血/缺氧及再灌注致中枢神经元细胞损伤的保护作用及其可能机制。方法 用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化细胞株(PC12 细胞)建立缺血/缺氧及再灌注损伤的细胞模型。实验分为缺血/缺氧及再灌注损伤(IR)组、丙泊酚(P)组、利血平(R)组、丙泊酚与利血平合用(PR)组。通过测定乳酸脱氢酶(LDH)含量及应用噻唑蓝(MTT)比色法测定存活细胞在波长 570 nm 处的吸光度(A)值用以判断细胞损伤程度,并观察两药单独或合用对损伤 PC12 细胞内游离钙离子浓度([Ca²⁺]_i)的影响。结果 与 IR 组比较,丙泊酚和利血平单用或联用组均可使 LDH 释放量明显降低,A 值升高(P<0.05 或 P<0.01)。合用利血平(40 μmol/L)后,不同浓度丙泊酚(12.4、37.3 和 112.0 μmol/L)组 LDH 释放量进一步降低,A 值则增高(P 均<0.05)。12.4 μmol/L 和 37.3 μmol/L 丙泊酚以及 40 μmol/L 利血平均可减轻由于缺血/缺氧及再灌注损伤引起的细胞内钙超载[(279.66±18.00)nmol/L 比(219.41±12.53)nmol/L, (279.66±18.00)nmol/L 比(210.50±11.03)nmol/L, (279.66±18.00) nmol/L 比(254.82±10.45)nmol/L, P<0.05 或 P<0.01];12.4 μmol/L 和 37.3 μmol/L 丙泊酚分别与 40 μmol/L 利血平合用时,[Ca²⁺]_i 进一步降至(191.19±10.36)nmol/L 和 (183.82±9.83)nmol/L, 与相同浓度丙泊酚组比较差异均有统计学意义(P 均<0.05)。结论 丙泊酚和利血平均对缺血/缺氧及再灌注损伤 PC12 细胞产生一定的保护作用,合用时保护作用更明显;其保护作用可能与减轻细胞内钙超载有关。

【关键词】 静脉麻醉药; 丙泊酚; 利血平; 缺血/再灌注损伤; 细胞,PC12

Protective effects of propofol combined with reserpine on cultured PC12 cells impaired by ischemia and reperfusion CAO Jiang-bei*, WANG Heng-lin, LI Yun-feng, MI Wei-dong. * Center of Anesthesiology and Operation, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To evaluate the protective action of propofol and reserpine, as well as a combination of the two drugs on cultured pheochromocytoma cells (PC12 cells) impaired by mimic ischemia reperfusion (IR), and its possible mechanisms. **Methods** PC12 cells were subjected to IR to reproduce the experimental model. They were divided into IR group, propofol (P) group, reserpine (R) group, and aspropofol/reserpine combined treatment (PR) group. The scale of cell impairment in each group was assessed by the content of lactate dehydrogenase (LDH) and by the absorption (A) at 570 nm with the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The change in [Ca²⁺]_i was detected by Fura-2/AM fluorescence assay after the treatment of propofol, reserpine, or both. **Results** Compared with IR group, the release of LDH was decreased and the A values increased in P, R and PR groups (P<0.05 or P<0.01). When combined with reserpine (40 μmol/L), different concentrations of propofol (12.4, 37.3 and 112.0 μmol/L) rendered the cells to release less LDH, with an increase in A value (all P<0.05). Both propofol (12.4 μmol/L and 37.3 μmol/L) and reserpine (40 μmol/L) could lessen the overload of intra-cellular calcium after IR [(279.66±18.00) nmol/L vs. (219.41±12.53) nmol/L, (279.66±18.00) nmol/L vs. (210.50±11.03) nmol/L, (279.66±18.00) nmol/L vs. (254.82±10.45) nmol/L, P<0.05 or P<0.01]. [Ca²⁺]_i could be further lowered when the cells were treated with propofol and reserpine in combination [(191.19±10.36) nmol/L and (183.82±9.83) nmol/L, both P<0.05]. **Conclusion** Both propofol and reserpine can protect cells from IR injury, and attenuate [Ca²⁺]_i overload induced by IR. The attenuation of [Ca²⁺]_i overload in impaired cells may be one of the mechanisms for their protective actions.

【Key words】 intravenous anesthetic; propofol; reserpine; ischemia/reperfusion injury; cells, PC12

研究显示,丙泊酚(propofol)作为临床常用的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571791)

作者单位:100853 北京,解放军总医院麻醉手术中心(曹江北,王恒林,米卫东);军事医学科学院毒物药物研究所(李云峰)

作者简介:曹江北(1974-),男(汉族),浙江省人,医学博士,主治医师。

静脉麻醉药,对多种器官的缺血/缺氧及再灌注损伤具有保护作用^[1-3]。动物实验证实,缺血/缺氧时中枢脑区儿茶酚胺可异常升高^[4],提示儿茶酚胺在缺血/缺氧及再灌注损伤的早期也有着重要作用。本研究中采用已分化的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化细胞

株(PC12 细胞)替代中枢神经元细胞,建立缺血/缺氧及再灌注损伤的细胞模型,观察静脉麻醉药丙泊酚以及儿茶酚胺耗竭剂利血平对缺血/缺氧及再灌注致 PC12 细胞损伤的保护作用,以及两者联合应用时所产生的效果变化,并探讨其可能的作用机制,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养:嗜铬细胞瘤株 PC12 细胞由北京大学万有博士惠赠。用含体积分数为 5%胎牛血清及 5%马血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM, 含有青霉素钠 200 kU/L,链霉素 100 kU/L, pH 7.4),调整细胞密度为 $1 \times 10^6/L$,每孔 100 μl ,接种于 96 孔培养板,放入 CO₂ 孵箱(美国 Napco 公司生产)中,37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 条件下培养 3~4 d,待细胞长满孔底后即可用于实验。

1.2 细胞存活性实验:将细胞分成 13 个组,每组 8 个孔。缺血/缺氧及再灌注损伤对照(IR)组:仅用含低糖无血清 DMEM 培养液。丙泊酚(P)组:分别用含 12.4(P1)、37.3(P2)、112.0(P3) $\mu mol/L$ 丙泊酚的低糖无血清 DMEM 培养液。利血平(R)组:分别用含 2.5 (R1)、10.0 (R2)、40.0 (R3) $\mu mol/L$ 利血平的低糖无血清 DMEM 培养液。丙泊酚与利血平联用(PR)组:①丙泊酚 12.4 $\mu mol/L$ 加利血平 2.5 (PR1)、10.0 (PR2)、40.0 (PR3) $\mu mol/L$ 的低糖无血清 DMEM 培养液;②丙泊酚 12.4 (P1R)、37.3 (P2R)、112.0 (P3R) $\mu mol/L$ 加利血平 40.0 $\mu mol/L$ 的低糖无血清 DMEM 培养液。将 96 孔板细胞用含 5%CO₂、95%N₂ 的混合气体通气 0.5 h 后,放入 CO₂ 孵箱中培养 14 h 后取出,吸出培养液,每孔分别加入含胎牛和马血清各 5%的高糖 DMEM 完全营养液 100 μl ,继续培养(模拟再灌注损伤)。4 h 后吸出培养液,用半自动生化仪(VITALAB 型,荷兰)测乳酸脱氢酶(LDH)浓度,检测试剂盒购自南京建成生物公司,操作按说明书。采用噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞存活率,用多孔扫描分光光度计(Versavex 型,美国典奥公司)测定样本在波长 570 nm 处的吸光度(A)值,以定量反映活细胞数。

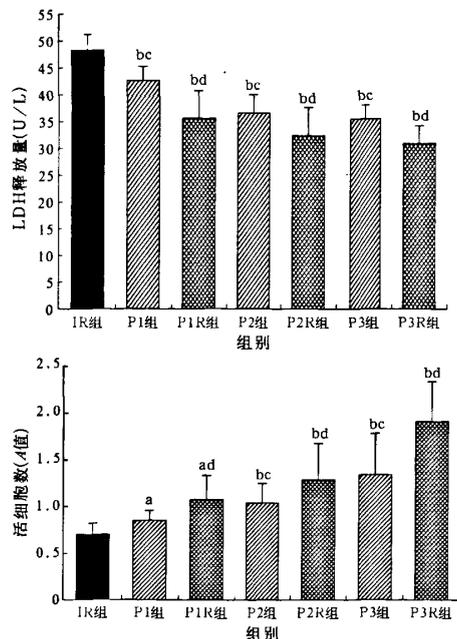
1.3 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度([Ca²⁺]_i)测定:将 PC12 细胞接种于 6 孔细胞培养板(Costar 型,美国)中,按前述方法培养 3~4 d,待细胞长满孔底后用于实验。[Ca²⁺]_i 浓度测定参照文献[5]方法稍加改进。使用 F-4500 荧光检测仪(日本 HITACH 公司)双波长(激发波长 340 nm 和 380 nm,发射波长 510 nm)测

定[Ca²⁺]_i 荧光值,测定结果由仪器自动按公式换算成[Ca²⁺]_i。

1.4 统计学方法:结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SAS 8.2 软件进行数据处理,组间比较行单因素方差分析和 Dunnett' t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

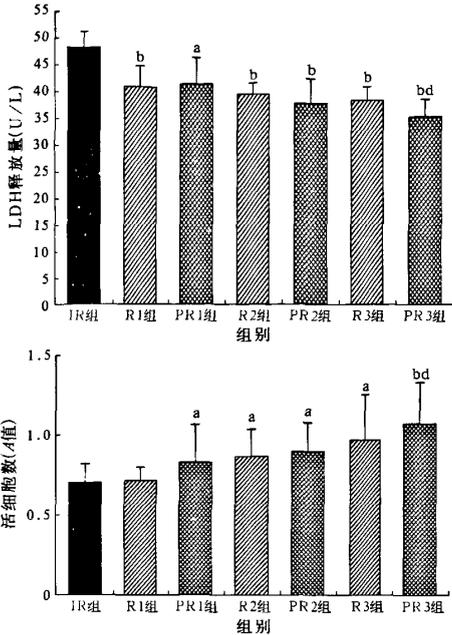
2 结 果

2.1 各组对缺血/缺氧及再灌注 PC12 细胞损伤的保护作用:图 1 显示,与 IR 组比较,LDH 释放量随丙泊酚浓度升高而降低,A 值则随浓度升高而升高(P<0.05 或 P<0.01);其中 P2、P3 组与 P1 组比较差异有统计学意义(P 均<0.05)。不同浓度丙泊酚与利血平 40 $\mu mol/L$ 合用后,LDH 释放量随丙泊酚浓度升高而降低,而 A 值升高更明显,且与相同剂量的丙泊酚组比较差异也有统计学意义(P 均<0.05)。图 2 结果显示,R1、R2、R3 组 LDH 释放量也显著降低,并使 A 值显著升高(P<0.05 或 P<0.01),但各组间差异无统计学意义(P 均>0.05)。丙泊酚 12.4 $\mu mol/L$ 与不同浓度利血平合用后,仅 PR3 组保护作用增强,表现为与相同剂量单纯利血平组比较,LDH 释放量进一步降低,A 值进一步升高(P 均<0.05)。



注:与 IR 组比较,*P<0.05, bP<0.01;与 P1 组比较, cP<0.05;与相同浓度丙泊酚组比较, dP<0.05

图 1 不同浓度丙泊酚与利血平 40 $\mu mol/L$ 单用或合用对缺血/缺氧及再灌注损伤 PC12 细胞的保护作用



注：与 IR 组比较，^a*P* < 0.05，^b*P* < 0.01；与相同浓度利血平组比较，^d*P* < 0.05

图 2 丙泊酚 12.4 μmol/L 与不同浓度利血平单用或合用对缺血/缺氧及再灌注损伤 PC12 细胞的保护作用

2.2 各组对缺血/缺氧及再灌注损伤 PC12 细胞 [Ca²⁺]_i 的影响(表 1)：与 IR 组比较，R 及 P1、P2 组 [Ca²⁺]_i 均显著下降 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。P1R、P2R 组 [Ca²⁺]_i 分别较 P1、P2 组进一步下降，差异有统计学意义 (*P* 均 < 0.05)。

表 1 丙泊酚与利血平单用或合用对缺血/缺氧及再灌注损伤 PC12 细胞 [Ca²⁺]_i 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	DMEM 中药物剂量 (μmol/L)		[Ca ²⁺] _i (nmol/L)
		丙泊酚	利血平	
IR 组	6	0	0	279.66 ± 18.00
R 组	6	0	40.0	254.82 ± 10.45 ^a
P1 组	6	12.4	0	219.41 ± 12.53 ^b
P2 组	6	37.3	0	210.50 ± 11.03 ^b
P1R 组	6	12.4	40.0	191.19 ± 10.36 ^d
P2R 组	6	37.3	40.0	183.82 ± 9.83 ^d

注：与 IR 组比较，^a*P* < 0.05，^b*P* < 0.01；与相同浓度丙泊酚组比较，^d*P* < 0.05

3 讨论

本实验中应用缺血/缺氧及再灌注致 PC12 细胞损伤的模型，进一步证实了丙泊酚对离体培养细胞缺血/缺氧及再灌注损伤具有保护作用，且在一定浓度范围内，保护作用呈剂量相关性，表现为 LDH

释放量降低和 A 值升高。利血平不仅对缺血/缺氧及再灌注损伤细胞有一定保护作用，而且还可明显增强丙泊酚的保护效果。而丙泊酚和利血平的细胞保护作用均与减轻细胞内钙超载相关。

缺血/缺氧及再灌注致神经损伤是由多环节、多路径介导的复杂病理生理变化过程^[6-8]。钙是维持细胞生理功能的重要离子，在缺血性神经元损伤中起着重要作用，钙在细胞内大量蓄积引起细胞内钙超载是导致细胞死亡的共同途径。近来的研究发现，儿茶酚胺释放可能是加重缺血性神经元损伤的另一重要原因^[9]。中枢儿茶酚胺异常释放不仅可促使细胞内兴奋性氨基酸递质(如谷氨酸)释放，激活 N-甲基-D-天冬氨酸受体-Ca²⁺-一氧化氮合酶(NMDA 受体-Ca²⁺-NOS)通路，其自身氧化代谢产物也可产生高活性的氧自由基，这两个因素均可导致细胞内钙超载而引起细胞的损伤乃至死亡。Martinez 等^[10]研究发现，耗竭脑内去甲肾上腺素可减轻大鼠海马缺血/再灌注后神经元的损伤。因此，在缺血/缺氧及再灌注损伤时，在抑制细胞内氧自由基生成及 NMDA 受体-Ca²⁺-NOS 通路激活的同时，如果能抑制细胞内儿茶酚胺的释放，可能会对细胞产生更为有效的保护作用。

研究发现，丙泊酚可抑制缺血/缺氧及再灌注损伤时神经元细胞内的氧自由基合成、NMDA 受体兴奋、NOS 合成以及 [Ca²⁺]_i 升高，从而对损伤的神经元产生保护作用^[11-12]。PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化细胞株，分化的 PC12 细胞在形态和功能上具有典型的神经内分泌细胞特征，被广泛用作研究神经细胞分化、离子通道、受体、递质分泌的实验材料，也是研究神经毒性常用的细胞株^[13]。PC12 细胞不仅可用来代替儿茶酚胺类神经元细胞，而且本实验室前期研究结果也提示，PC12 细胞与中枢海马及皮质神经元细胞有一些共同的特性。

利血平是囊泡内单胺类转运体的高效抑制剂，可以严重抑制 PC12 细胞囊泡内单胺类转运体 (VMAT) 功能^[14]。Antunes 等^[15]研究发现，利血平耗竭小囊泡内的多巴胺后可减轻一氧化氮(NO)对 PC12 细胞线粒体的损害作用。本研究结果提示，利血平可减轻缺血/缺氧及再灌注对 PC12 细胞损伤的作用，而且可能增强丙泊酚的保护效应。我们的实验结果与 Antunes 等的研究结果相似，但作用机制仍需进一步研究。这一结果提示，单胺递质特别是儿茶酚胺类单胺递质可能在缺血/缺氧及再灌注损伤的早期也起着重要作用，而它们的作用也与最终降

低 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度有关。

综上所述,在缺血/缺氧及再灌注损伤的早期应用利血平可以对 PC12 细胞产生一定的保护作用;与丙泊酚合用时,细胞保护效应进一步增强;儿茶酚胺在缺血/缺氧及再灌注损伤过程中的早期可能具有神经毒性作用,其作用可能与细胞内钙超载相关。

参考文献

- [1] Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics[J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2002, 14(1): 66-79.
- [2] 桂波, 曹红, 曾因明. ERK1/2 参与丙泊酚预处理对肾性高血压大鼠离体心肌缺血再灌注损伤的作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 76-80.
- [3] 胡晓敏, 吕阳, 姚尚龙. 丙泊酚对大鼠肠缺血/再灌注后肺细胞间黏附分子-1 蛋白表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1): 53-56.
- [4] Hayashi H, Sato K, Kuruha Y, et al. Microsphere embolism-induced changes in noradrenaline release in the cerebral cortex in rats[J]. Brain Res, 1998, 783(2): 241-248.
- [5] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties [J]. J Biol Chem, 1985, 260(6): 3440-3450.
- [6] 韩遵义, 杨光田. 左旋四氢巴马汀对脑缺血/再灌注大鼠脑组织血红素氧化酶-1 及内源性一氧化氮的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(2): 89-92.
- [7] 赵攀, 熊利泽, 董海龙, 等. 远程缺血预处理对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(6): 340-342.
- [8] 唐伟, 邹枫, 针刺预处理对脑缺血/再灌注大鼠脑水肿及腺苷水平的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 166-168.
- [9] Mitsuyo T, Adachi N, Yorozuya Y, et al. Facilitation of ischemia-induced release of dopamine and neuronal damage by dexamethasone in the rat striatum[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 465(3): 267-274.
- [10] Martinez G, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. Effects of norepinephrine depletion in rats during cerebral post-ischemic reperfusion[J]. Neurotoxicology, 2004, 25(5): 877-884.
- [11] 王恒林, 曹江北, 王卓强, 等. 丙泊酚对 N-甲基-D-天冬氨酸所致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2003, 17(3): 202-206.
- [12] 梁敏, 史克珊, 曹作为, 等. 异丙酚对颅脑手术期患者一氧化氮影响的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(1): 15-18.
- [13] Shafer TJ, Atchison WD. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies[J]. Neurotoxicology, 1991, 12(3): 473-492.
- [14] 叶民, 丁新生, 董海蓉, 等. 转基因 CHO 细胞中的 VMAT2 抗毒性作用的研究[J]. 临床神经病学杂志, 2002, 15(2): 69-72.
- [15] Antunes F, Han D, Rettori D, et al. Mitochondrial damage by nitric oxide is potentiated by dopamine in PC12 cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1556(2-3): 233-238.

(收稿日期: 2007-11-17 修回日期: 2008-08-22)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

盲肠结扎穿孔导致循环衰竭时核转录因子- κ B 对抗利尿激素 V1A 受体的调节作用

最近德国学者对盲肠结扎穿孔致循环衰竭时核转录因子- κ B(NF- κ B)和细胞因子的变化及炎症时抗利尿激素 V1A 受体调控做了相关研究。他们采用雄性 C57/BL6 系小鼠制备盲肠结扎穿孔致循环衰竭模型。动物分为细胞因子基因沉默组、糖皮质激素基因沉默组、NF- κ B 基因沉默组、糖皮质激素和 NF- κ B 基因沉默组、去除 RNA 的 NF- κ B 基因沉默组和抗利尿激素 V1A 受体激动剂组,观察其血流动力学参数和抗利尿激素 V1A 受体表达的变化以及细胞因子对 V1A 受体表达的影响。结果发现:盲肠结扎穿孔导致抗利尿激素 V1A 受体功能下调和严重的循环衰竭,应用激动剂后的 V1A 受体对血压变化仍不敏感;地塞米松抑制了炎症细胞因子的产生,改善循环衰竭的同时减轻了 V1A 受体下调的程度;肿瘤坏死因子- α 、 γ -干扰素、白细胞介素- β 等细胞因子减弱抗利尿激素 V1A 受体的表达,减弱的程度与细胞因子的剂量相关,而在细胞因子基因沉默组无变化。强烈抑制 NF- κ B 后细胞因子产生减少,循环衰竭改善,抗利尿激素 V1A 受体表达增加,脓毒症动物存活率提高。因此他们得出结论:脓毒症中促炎症细胞因子的升高导致抗利尿激素 V1A 受体表达下调,并能解释只用单一细胞因子治疗脓毒症失败而应用地塞米松成功的原因,同时也说明了 NF- κ B 在脓毒症休克发病机制中的重要作用。

侯经元, 编译自《Crit Care Med》, 2008, 36(8): 2363-2372; 胡森, 审校

白细胞介素-6 和前降钙素在儿童脓毒症和脓毒性休克中的应用

巴西学者最近对儿童脓毒症时白细胞介素-6(IL-6)和前降钙素(PCT)水平及其差异进行了研究。研究纳入 28 d~14 岁的患儿 90 例,分为脓毒症组(SG)和脓毒性休克组(SSG),于入院时(T0)和入院后 12 h(T12 h)测量 IL-6 和 PCT。结果发现:T0 时 SSG 组出现较高水平 PCT 的比例要比 SG 组多(69.7%比 29.8%),T12 h 出现了同样显著差异的结果;较高水平 PCT 的 SSG 组患儿死亡危险评分(PRISM 评分)也显著高于 SG 组患儿;T0 时 SSG 组 IL-6 水平显著高于 SG 组,但在 T12 h 差异无统计学意义;入院时 IL-6 水平与 PRISM 评分呈正相关。因此他们认为:IL-6 和 PCT 与儿童脓毒症的严重程度呈正相关,对早期病情评估有一定的价值。

侯经元, 编译自《Cytokine》, 2008, 43(2): 160-164; 胡森, 审校