

·论著·

丙泊酚预处理对谷氨酸损伤大鼠脑组织的保护作用研究

周晓峰 黄丁丁 王迪芬 付江泉

【摘要】 目的 探讨丙泊酚预处理对谷氨酸(Glu)损伤大鼠脑组织的保护作用。**方法** 取出生 10~15 d SD 大鼠脑皮质切片进行培养,观察脑片形态学变化。将脑皮质切片分为空白对照组、Glu 损伤组(1 mmol/L Glu 作用 0.5 h)及丙泊酚预处理组(损伤前给予 20 mg/L 丙泊酚作用 24 h),每组 12 个样本。镜下观察各组脑皮质切片的细胞病理改变及超微结构变化,计算乳酸脱氢酶(LDH)漏出率,免疫组化法检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性表达并计数。**结果** 培养的脑皮质切片细胞形态完整、存活良好。苏木素-伊红(HE)染色、电镜及 LDH 检测结果显示:Glu 损伤组脑皮质切片中神经元细胞损伤严重,形态不规则,胶质细胞增生、水肿,LDH 漏出率较空白对照组明显增高[(68.5±2.0)%比(16.0±2.5)%, $P<0.01$];丙泊酚预处理组脑皮质切片神经元细胞损伤减轻,细胞形态恢复,LDH 漏出率较 Glu 损伤组明显减少[(38.5±2.4)%比(68.5±2.0)%, $P<0.05$]。免疫组化检测结果显示:Glu 损伤组胶质细胞胞体肿胀,突起数量增多,GFAP 阳性反应强,阳性细胞数量(个/HP)较空白对照组显著增多(50±5 比 10±3, $P<0.01$);丙泊酚预处理组胶质细胞形态有所恢复,细胞突起细长,GFAP 阳性反应减弱,阳性细胞数量较 Glu 损伤组明显减少(30±4 比 50±5, $P<0.05$)。**结论** 丙泊酚预处理对 Glu 损伤的 SD 大鼠脑皮质神经元具有保护作用。

【关键词】 丙泊酚; 预处理; 谷氨酸; 脑损伤; 胶质纤维酸性蛋白

The protective effect of propofol pretreatment on glutamate injury of neonatal rat brain slices ZHOU Xiao-feng*, HUANG Ding-ding, WANG Di-fen, FU Jiang-quan. *Department of Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China
Corresponding author: WANG Di-fen, Email: dfwang6@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the protective effect of propofol precondition against glutamate (Glu) neurotoxicity to neonatal rat cerebrocortical slices. **Methods** Brain slices of Sprague-Dawley (SD) rats were cultured in vitro and observed the morphologic changes. Brain slices were randomly divided into three groups: blank control group, Glu injury group (1 mmol/L Glu for 0.5 hour), propofol precondition group (20 mg/L propofol for 24 hours), each $n=12$. Changes in pathological and ultra-structure of cells were observed using microscope. Lactate dehydrogenase (LDH) leakage rate was measured. Meanwhile, the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was detected by immunohistochemical technology, then the positive cell were counted. **Results** Cultured brain slices of cell were intact and survived well. Hematoxylin-eosin (HE) staining, electron microscopy and LDH test results showed that cerebral film neuron severely damage, gliosis, edema, LDH leakage rate in Glu injury group were significantly more severe compared with blank control group [(68.5±2.0)% vs. (16.0±2.5)%, $P<0.01$]. Reduce the brain slice of the propofol pretreatment group of neuronal cell jury, cell shape recovery significantly reduced LDH leakage rate compared with the Glu injury group [(38.5±2.4)% vs. (68.5±2.0)%, $P<0.05$]. Immunohistochemical detection of GFAP expression of Glu injury group glial cell body swelling, producing increase in the number of GFAP positive reaction strong, the number of positive cells (cells/HP) compared with blank control group was significantly increased (50±5 vs. 10±3, $P<0.01$). The recovery of propofol pretreatment group glial cell morphology, cell processes slender GFAP positive reaction decreased the number of positive cells compared with the Glu injury group was significantly decreased (30±4 vs. 50±5, $P<0.05$). **Conclusion** Propofol pretreatment has prote ctive effect against Glu injured rat cerebrocortical slices.

【Key words】 Propofol; Pretreatment; Glutamate; Brain injury; Glial fibrillary acidic protein

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.12.015

基金项目:国家临床重点专科建设项目(2010SY3079);贵州省科技攻关计划项目(SY20103079);贵州省贵阳市科技攻关项目([2010]筑科农合同字第 1-社-16 号)

作者单位:550004 贵州,贵阳医学院附属医院重症医学科[周晓峰(现在湖北医药学院附属太和医院麻醉科工作)、王迪芬、付江泉];上海市第六人民医院麻醉科(黄丁丁)

通信作者:王迪芬,Email:dfwang6@yahoo.com.cn

临床上常见的脑外科手术如脑膜瘤切除术、颈静脉剥脱术、颅内动脉瘤夹闭术等术中行控制性降压、血管夹闭再通等均可引起脑组织再灌注损伤,导致患者神经功能障碍。脑缺血/再灌注(I/R)损伤与自由基生成、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性、线粒体功能障碍等有关。目前丙泊酚的神经保护作用受到国内外的关注,相关实验主要在细胞培养及动

物模型中展开,然而其在离体脑片水平的神经保护作用还未见报道。由于谷氨酸(Glu)损伤模型是目前常用的体外脑 I/R 损伤模型,因此,本实验中采用大鼠离体脑片培养,建立脑片 Glu 损伤模型,研究丙泊酚预处理对大鼠脑片 Glu 损伤的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂:出生 10~15 d SD 大鼠,由贵阳医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(黔)20080851。DMEM/F12(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物科技公司),丙泊酚(英国阿斯利康公司),乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(南京建成生物科技公司),四甲基偶氮唑盐(TTC)染料(美国 Gibco 公司)。

1.2 大鼠脑片体外培养:处死大鼠断头取脑,迅速置于预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)中,切片。部分脑片在 6 孔培养板内培养;另一部分脑片组织于切片后立即用 TTC 染色,一般为均匀红色,若脑片出现着色偏浅或明显损伤则不予采用。

脑片培养条件:每个培养皿上放 1 个脑片并置于 37℃、5%CO₂、95%O₂ 的标准培养箱中培养,保持脑片在气液界面上进行培养。培养的第 1 个 24 h 换液 1 次,以后每 2 d 换液 1 次,每次换液 1 ml。

脑片培养基成分:DMEM/F12 溶液 80 ml,胎牛血清 20 ml,10 kU/ml 青霉素和 10 kU/ml 链霉素溶液各 1 ml,pH 7.2。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 实验分组及处理:将培养 3 d 的脑片用随机数字表法分为空白对照组、Glu 损伤组及丙泊酚预处理组,每组 12 个样本。采用 1 mmol/L Glu 损伤 0.5 h 复制 Glu 损伤模型。丙泊酚预处理组于损伤前予以丙泊酚 20 mg/L 预处理 24 h。各组于损伤 30 min 后换正常培养基继续培养 24 h。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 脑片形态观察:倒置显微镜下于每次换液前观察培养基中脑片形态、生长状态及存活情况。

1.4.2 细胞形态观察:将石蜡切片脱蜡后进行苏木素-伊红(HE)染色;0.5%盐酸乙醇分化,氨水乙醇返蓝,加入二甲苯,中性树脂封片,光镜下观察。

1.4.3 细胞超微结构观察:将脑片浸入 2.5%戊二醛中,PBS 冲洗,1%锇酸处理样品至变黑,再经 PBS 漂洗;室温下经丙酮 30%、50%、70%、80%、90%的梯度每级作用 30 min,纯丙酮作用 3 次,每次 30 min;渗透、包埋、超薄切片;醋酸铀-柠檬酸铅染色,用透射电镜观察切片。

1.4.4 LDH 测定:每次换液前在 450 nm 波长下测定培养基的吸光度(A)值,以代表相应时间点培养基中的 LDH 含量。LDH 漏出率=培养基 LDH 的 A 值/组织匀浆液 LDH 的 A 值×100%。

1.4.5 免疫组化法检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达及 GFAP 阳性胶质细胞计数:取出恒温烤箱中的切片,脱蜡后 PBS 洗 3 次,用 GFAP 进行抗原修复,顺序滴加兔抗 GFAP 抗体、生物素标记的二抗后置湿盒中孵育 30 min;PBS 洗 3 次,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。GFAP 阳性的星形胶质细胞为胞体和突起同时被染为棕褐色,核为蓝色。计数方法:在 400 倍显微镜下计数视野内阳性细胞,每张切片选 5 个视野,然后对所得数据进行统计分析。

1.5 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析使用 SPSS 11.5 软件,资料符合正态分布且方差齐则用单因素方差分析,均数两两比较用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察脑片:脑片在培养周期内形态保持完好,倒置显微镜下观察脑片随着培养周期延长逐渐变薄并透亮。

2.2 光镜下观察细胞形态变化:空白对照组脑片层次清楚,各层神经元数量多、密度大,胞内核圆呈蓝色,部分可见明显核仁,神经元周围有胶质细胞(图 1a)。Glu 损伤组神经元数量及密度明显减少,部分细胞卷曲、皱缩变形,胶质细胞明显增多(图 1b)。丙泊酚预处理组神经元细胞数量增多,细胞形态恢复,部分细胞轻度水肿(图 1c)。

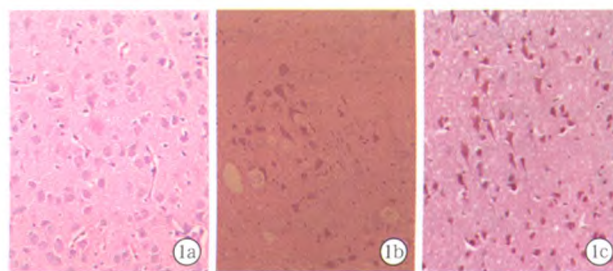


图 1 光镜下观察各组体外培养大鼠脑片细胞形态改变 空白对照组(a)神经元数量多、密度大;谷氨酸损伤组(b)神经元细胞卷曲、皱缩变形;丙泊酚预处理组(c)神经元细胞形态恢复,部分细胞水肿 HE 高倍放大

2.3 透射电镜下观察细胞超微结构改变:空白对照组可见神经元细胞核仁明显,核染色质均匀,核膜呈两暗一明、均质正常;细胞质内各种细胞器丰富、正常,胞质线粒体、粗面内质网结构完好(图 2a)。Glu 损伤组核染色质边集、核膜破裂,线粒体肿胀空

化,粗面内质网溶解、消失(图 2b)。丙泊酚预处理组核膜融合、裂隙增宽,胞质内细胞器数量明显减少,部分粗面内质网扩张见局灶溶解(图 2c)。

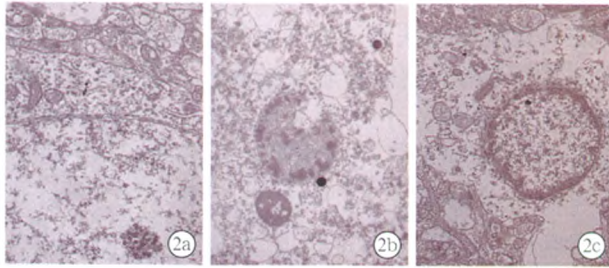


图 2 透射电镜下观察各组体外培养大鼠脑片细胞超微结构改变 空白对照组(a)核仁明显,核染色质均匀,核膜呈两暗一明,胞质线粒体、粗面内质网结构完好;谷氨酸损伤组(b)核染色质边集、核膜破裂;丙泊酚预处理组(c)核膜融合、裂隙增宽,胞质内细胞器数量明显减少 醋酸铀-柠檬酸铅 高倍放大

2.4 培养液中 LDH 含量及各组脑片 LDH 漏出率(表 1):培养最初 3 d 内 LDH 波动较大,1 d LDH 含量较高,其后逐渐下降并在培养 3~9 d 保持在一个较低的水平,至 11 d 再次下降。在培养期内,Glu 损伤组和丙泊酚预处理组培养液中 LDH 释放量及 LDH 漏出率较空白对照组明显增加(均 $P<0.01$);丙泊酚预处理组培养液中 LDH 释放量及 LDH 漏出率较 Glu 损伤组减少(均 $P<0.05$)。

表 1 各组大鼠脑片 LDH 漏出率及 GFAP 阳性胶质细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH 漏出率(%)	GFAP 阳性细胞数(个/HP)
空白对照组	16.0 ± 2.5(12)	10 ± 3(10)
Glu 损伤组	68.5 ± 2.0(12) ^a	50 ± 5(10) ^a
丙泊酚预处理组	38.5 ± 2.4(12) ^{ab}	30 ± 4(10) ^{ab}

注:LDH:乳酸脱氢酶,GFAP:胶质纤维酸性蛋白;与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与 Glu 损伤组比较,^b $P<0.05$;括号内为样本数

2.5 GFAP 阳性表达结果及 GFAP 阳性胶质细胞计数:空白对照组星形胶质细胞均匀分布,细胞核较小、呈圆形或卵圆形,细胞突起细长,GFAP 阳性的星形胶质细胞表达少,阳性反应弱(图 3a)。Glu 损伤组星形胶质细胞胞体肥大、突起增多,GFAP 阳性的星形胶质细胞表达增加,阳性反应强(图 3b);与空白对照组比较,GFAP 阳性胶质细胞计数明显增加($P<0.01$;表 1)。与 Glu 损伤组相比,丙泊酚预处理组 GFAP 阳性星形胶质细胞数量表达减少,阳性反应减弱,胶质细胞形态有所恢复,不规则,细胞突起细长(图 3c);GFAP 阳性胶质细胞计数较 Glu 损伤组显著减少($P<0.05$;表 1)。

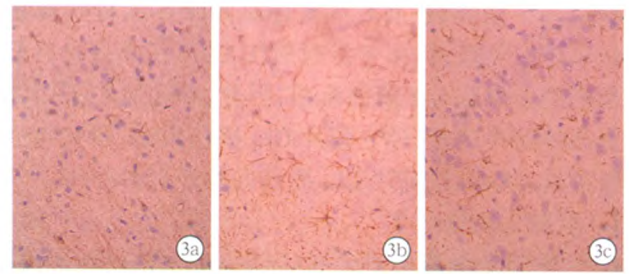


图 3 光镜下观察各组体外培养大鼠脑片胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性表达 空白对照组(a)胶质细胞均匀分布,突起细长,GFAP 阳性胶质细胞表达少;谷氨酸损伤组(b)GFAP 阳性星形胶质细胞表达增加;丙泊酚预处理组(c)胶质细胞形态有所恢复,不规则,GFAP 阳性胶质细胞表达减少 免疫组化 高倍放大

3 讨论

Glu 是中枢神经系统中兴奋性突触的主要神经递质,它不仅具有营养神经、促进神经细胞生长发育的作用,而且也是一种神经毒素,在脑缺血、缺氧损伤中发挥着重要作用。当脑损伤或缺血后大量释放到突触间隙,Glu 受体过度激活可引起一系列细胞损伤反应。本实验中采用 1 mmol/L 的 Glu 作用 0.5 h,结果显示,脑片中神经元细胞损伤严重,形态不规则,胶质细胞增生、水肿;胶质细胞胞体肿胀,突起数量增多,GFAP 阳性反应强,阳性细胞数量显著增多,说明 Glu 损伤后胶质细胞进入激活状态,活性增强,提示本实验成功建立了脑片 Glu 损伤模型。

丙泊酚作为一种新型的静脉麻醉药,在许多临床研究及动物实验均证实其具有一定的脑保护作用^[1],其作用机制是多途径、多位点的,包括:清除自由基及抑制脂质过氧化的抗氧化作用^[2-3];减轻兴奋性氨基酸的堆积^[3-5];增强 γ -氨基丁酸(GABA)的作用^[6];抑制细胞凋亡等。在体实验研究方面,梁敏等^[7]证实丙泊酚可显著减小局灶性缺血的脑梗死面积;抑制缺血导致的促凋亡相关蛋白表达,对轻度局灶性脑缺血的神经保护作用可以持续到损伤后 4 周;同时还可减轻海马区的延迟性神经细胞死亡。在离体实验研究方面,Adembri 等^[8]通过大鼠海马脑片氧糖剥夺后复氧复糖模型发现,低浓度丙泊酚(30 μ mol/L)亦可减少神经细胞损伤及海马 CA1 区锥体细胞超微结构损伤。

LDH 是一种稳定的蛋白质,存在于正常细胞的胞质中,一旦细胞膜受损,LDH 即被释放到细胞外,通过检测培养液中 LDH 的活性可判断细胞受损的程度。本实验结果显示,丙泊酚预处理组培养液中 LDH 释放率较 Glu 损伤组明显减少;脑片神经元细胞损伤减轻,细胞形态恢复,数量增多;胶质细胞形

态有所恢复,细胞突起细长,GFAP 阳性细胞数量表达减少,阳性反应减弱,上述指标表明丙泊酚预处理对脑片 Glu 损伤起到一定的保护作用,推测其保护作用可能与其减少组织内的兴奋性氨基酸(Glu)的释放以及增强 GABA 受体的作用、抑制 Glu 受体介导的兴奋性突触传递降低细胞内钙超载产生一定的保护作用等因素有直接的关系。

综上所述,本实验中成功建立脑片体外培养技术,在建立脑片 Glu 损伤模型基础上,通过 HE 染色、透射电镜、LDH 的检测及 GFAP 的表达和阳性细胞数目变化等指标,说明丙泊酚预处理对脑片 Glu 损伤起到保护作用。

参考文献

- [1] Jin K, Sun Y, Xie L, et al. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24: 171-189.
- [2] Sagara Y, Hendler S, Khoh-Reiter S, et al. Propofol hemisuccinate protects neuronal cells from oxidative injury. *J Neurochem*, 1999, 73: 2524-2530.
- [3] 黄绍农, 刘友坦, 张嘉新, 等. 不同通气状态下丙泊酚对颅脑损伤患者脑组织氧分压的影响. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 693-694.
- [4] 刘辉, 王迪芬, 付江泉. 异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 691-692.
- [5] 姚娜, 王迪芬, 宋曦, 等. 依达拉奉联合异丙酚预处理对乳鼠离体脑皮质细胞缺血/再灌注损伤保护作用的研究. *中国危重病急救医学*, 2012, 24: 286-289.
- [6] Saransaari P, Oja SS. Enhanced GABA release in cell-damaging conditions in the adult and developing mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci*, 1997, 15: 163-174.
- [7] 梁敏, 李艳, 王宇田. 丙泊酚对大鼠脑创伤后神经细胞死亡相关蛋白激酶 mRNA 表达及凋亡的影响. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 697-698.
- [8] Adembri C, Venturi L, Tani A, et al. Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia: inhibition of mitochondrial swelling as a possible mechanism. *Anesthesiology*, 2006, 104: 80-89.

(收稿日期:2012-06-18)

(本文编辑:李银平)

• 病例报告 •

阿奇霉素过敏致死 1 例报告

曾丽莎

【关键词】 阿奇霉素; 不良反应; 过敏死亡

阿奇霉素为大环内酯类抗菌药物,临床上常用于治疗细菌感染,与中药制剂联合使用治疗肺炎或病毒感染时也常获得很好的疗效^[1-2]。近年来,随着阿奇霉素在临床上应用的日趋广泛,其不良反应也高于预期。现报告 1 例因阿奇霉素过敏而导致死亡病例。

1 病例情况

本院 2009 年 11 月 16 日接诊 1 例上呼吸道感染的 52 岁女性患者。体温 37.7℃,心肺无异常,自入病室诉咽喉咳嗽。给予 0.9% 生理盐水 500 ml、阿奇霉素 0.5 g、维生素 B6 注射液 0.1 g 静脉输入抗感染治疗,患者在输入阿奇霉素后约 0.5 h 出现心悸、胸闷、面色苍白、口唇发绀、呼吸困难加重、意识不清、血压急剧下降,很快呼吸、心跳停止。立即进行

吸氧、胸外心脏按压、气管插管、人工呼吸,抢救期间使用肾上腺素、多巴胺、呼吸兴奋剂等,抢救 50 min 复苏失败,宣布患者临床死亡。

2 讨论

可通过阻碍细菌转肽过程而抑制细菌蛋白质的合成。阿奇霉素具有对酸稳定、半衰期长、感染部位组织及细胞内密度高等优点。因此,其临床应用时疗效显著,安全性和耐受性都较好。但随着阿奇霉素临床应用的不断增加和用药范围的不断扩大,其不良反应的报道也不断增加,其中以药物过敏为多,也出现过敏死亡病例的报道^[3]。该患者输注阿奇霉素后 0.5 h 出现不良反应,虽经全力抢救,最终无效死亡。

虽然在临床应用时阿奇霉素不需要做皮试,但从文献报道和上述病例来看使用时一定要谨慎,要密切观察患者用药后的变化,多巡视、多询问,一旦出现过敏反应,应立即停药抢救。

阿奇霉素作为一种长效抗菌药物,其血清半衰期可长达 35~48 h,在儿童、老年人或有特殊疾病、肝肾功能不全的人群使用时,更容易发生不良反应,应提醒医生和患者予以足够的重视。目前有研究显示,用痰热清注射液联合阿奇霉素治疗社区获得性肺炎患者较单独使用阿奇霉素可明显提供临床疗效,且无明显不良反应^[1]。

参考文献

- [1] 张晓洁, 周可幸, 陈志明. 痰热清注射液治疗社区获得性肺炎的疗效观察. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17: 292-294.
- [2] 庞学智, 张金泉. 中西医结合治疗甲型 H1N1 流感 56 例临床疗效探讨. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 262.
- [3] 李宇峰, 栾好波. 阿奇霉素致过敏性休克 2 例. *齐鲁药事*, 2004, 23: 61.

(收稿日期:2012-10-01)

(本文编辑:李银平)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.12.016

作者单位: 430070 湖北武汉, 华中农业大学医院