

AMPA受体对丙泊酚诱导新生大鼠海马线粒体损伤的调控作用

王晨旭 周琰 谢克亮 元元 王国林 于泳浩

天津医科大学总医院麻醉科,天津市麻醉学研究所,天津 300052

通信作者:于泳浩,Email:yuyonghao@126.com

【摘要】目的 探讨丙泊酚是否对新生大鼠海马线粒体造成损伤,以及兴奋性氨基酸受体 AMPA 受体的调控作用。**方法** 将 48 只 7 日龄 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、丙泊酚组、丙泊酚+AMPA 受体激动剂 AMPA 组(丙泊酚+AMPA 组)和丙泊酚+AMPA 受体抑制剂 CNQX 组(丙泊酚+CNQX 组),每组 12 只。丙泊酚各组大鼠腹腔注射 30 mg/kg 丙泊酚,对照组注射生理盐水 3 mg/kg;各组均于首次给药后每隔 20 min 给予首剂量的 1/2,每日 3 次,连续注射 3 d。丙泊酚+AMPA 组和丙泊酚+CNQX 组分别于首次给药后经左侧脑室注射 1 g/L 的 AMPA 或 CNQX 5 μ L。各组给药 3 d 后处死大鼠取脑组织,采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测海马 AMPA 受体谷氨酸受体(GluR1、GluR2)亚单位的总蛋白(T)及膜蛋白(M)表达量,并计算二者比值(M/T);采用 Western blotting 检测线粒体动力相关蛋白-1(DRP-1)、磷酸化 DRP-1(p-DRP-1)和线粒体融合蛋白 2(Mfn2)表达;同时测定海马三磷酸腺苷(ATP)含量及 ATP 相关酶活性。**结果** 与对照组相比,丙泊酚处理后大鼠海马 GluR1 的表达及其 M/T 比值均明显升高,而 GluR2 的表达及其 M/T 比值则明显降低,ATP 含量及 ATP 相关酶活性明显下降,同时 DRP-1 表达及其磷酸化水平明显升高,而 Mfn2 表达明显下降,说明反复多次腹腔注射 30 mg/kg 丙泊酚可导致神经细胞线粒体损伤。与丙泊酚组比较,加入 AMPA 激动剂后,GluR1 表达及其 M/T 比值进一步升高[T-GluR1 蛋白(T-GluR1/ β -actin): 2.41 ± 0.29 比 1.72 ± 0.11 ,M-GluR1 蛋白(M-GluR1/ β -actin): 1.18 ± 0.15 比 0.79 ± 0.09 ,M/T 比值: 0.78 ± 0.12 比 0.46 ± 0.08 ,均 $P < 0.01$];GluR2 表达明显升高[T-GluR2 蛋白(T-GluR2/ β -actin): 0.65 ± 0.13 比 0.30 ± 0.14 , $P < 0.01$;M-GluR2 蛋白(M-GluR2/ β -actin): 0.17 ± 0.05 比 0.13 ± 0.07 , $P > 0.05$],但其 M/T 比值进一步降低(0.27 ± 0.10 比 0.41 ± 0.08 , $P < 0.05$);ATP 相关酶活性进一步降低,ATP 含量进一步下降($\mu\text{mol/g}$: 0.32 ± 0.07 比 0.70 ± 0.10 , $P < 0.01$);线粒体 DRP-1 表达及其磷酸化水平进一步升高[DRP-1 蛋白(DRP-1/GAPDH): 2.75 ± 0.36 比 1.70 ± 0.19 ,p-DRP-1 蛋白(p-DRP-1/GAPDH): 0.99 ± 0.14 比 0.76 ± 0.15 ,均 $P < 0.05$],Mfn2 表达进一步下降(Mfn2/GAPDH): 0.23 ± 0.12 比 0.54 ± 0.12 , $P < 0.05$],说明 AMPA 激动剂增加了大鼠神经细胞膜上 AMPA 受体 GluR1 亚单位的表达,同时使 GluR2 向细胞内移动,从而加剧了丙泊酚所致的线粒体损伤。而加入 AMPA 抑制剂后,与丙泊酚组比较,GluR1 表达及其 M/T 比值均明显降低[T-GluR1 蛋白(T-GluR1/ β -actin): 0.99 ± 0.14 比 1.72 ± 0.11 ,M-GluR1 蛋白(M-GluR1/ β -actin): 0.21 ± 0.07 比 0.79 ± 0.09 ,M/T 比值: 0.21 ± 0.07 比 0.46 ± 0.08 ,均 $P < 0.01$];GluR2 表达变化则不明显,但其 M/T 比值明显升高(0.59 ± 0.09 比 0.41 ± 0.08 , $P < 0.05$);ATP 酶活性明显升高,且 ATP 含量明显上升($\mu\text{mol/g}$: 0.87 ± 0.12 比 0.70 ± 0.10 , $P < 0.05$);线粒体 DRP-1 表达及其磷酸化水平明显下降[DRP-1 蛋白(DRP-1/GAPDH): 1.18 ± 0.17 比 1.70 ± 0.19 ,p-DRP-1 蛋白(p-DRP-1/GAPDH): 0.37 ± 0.10 比 0.76 ± 0.15 ,均 $P < 0.05$],而线粒体 Mfn2 表达则明显升高(Mfn2/GAPDH): 0.78 ± 0.10 比 0.54 ± 0.12 , $P < 0.05$],说明 AMPA 抑制剂通过抑制 GluR1 亚单位的表达,促使 GluR2 亚单位向细胞膜移动,从而缓解了丙泊酚导致的大鼠脑组织线粒体产能及动力学损伤。**结论** 连续 3 d 多次腹腔注射丙泊酚 30 mg/kg,可引起 7 日龄新生大鼠海马 AMPA 受体 GluR1 亚单位表达升高且主要分布于细胞膜,GluR2 亚单位表达下降且向细胞内移动,从而导致线粒体功能及动力学损伤;AMPA 受体激动剂可加重上述损伤,而 AMPA 受体抑制剂可减轻这一损伤。

【关键词】 丙泊酚; AMPA 受体; 线粒体; 新生大鼠

基金项目:天津市科技计划项目(20JCQNJC01050);天津市教委科研计划项目(2019KJ201)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210926-01402

Regulation of AMPA receptor on propofol induced hippocampal mitochondrial injury in neonatal rats

Wang Chenxu, Zhou Yan, Xie Keliang, Yuan Yuan, Wang Guolin, Yu Yonghao

Department of Anesthesiology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin Research Institute of Anesthesiology, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Yu Yonghao, Email: yuyonghao@126.com

【Abstract】Objective To investigate whether propofol can cause injury to hippocampal mitochondria in neonatal rats and the regulation of excitatory amino acid receptor AMPA receptor. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley (SD) rats aged 7 days were randomly divided into control group, propofol group, propofol+AMPA receptor agonist AMPA group (propofol+AMPA group) and propofol+AMPA receptor inhibitor CNQX group (propofol+CNQX group), with 12 rats

in each group. The rats in the propofol groups were intraperitoneally injected with 30 mg/kg propofol, while in control group with 3 mg/kg normal saline. Each group was given 1/2 of the first dose every 20 minutes after the first administration, three times a day, for three consecutive days. The rats in the propofol+AMPA group and the propofol+CNQX group were injected with 1 g/L AMPA or CNQX 5 μ L through left ventricle after the first administration. Three days after administration, the rats were sacrificed to obtain brain tissue. Western blotting was used to determine the expression of AMPA receptor glutamate receptors (GluR1, GluR2) subunit totally (T) and on membrane (M) in hippocampus. The expression of dynamin-related protein-1 (DRP-1) and phosphorylated-DRP-1 (p-DRP-1) and mitofusin 2 (Mfn2) related to mitochondrial fission and fusion were determined. The adenosine triphosphate (ATP) content and ATPase activity were determined. **Results** Compared with the control group, GluR1 expression and its M/T ratio were significantly increased after treatment of propofol, GluR2 expression and its M/T ratio were significantly decreased, the ATP content and ATP-related enzyme activity were decreased significantly, while the expression of DRP-1 and its phosphorylation was significantly increased, and the expression of Mfn2 was significantly decreased. The changes indicated that repeated intraperitoneal injection of 30 mg/kg propofol leading to the injury of mitochondria in neural cells. Compared with the propofol group, the GluR1 expression and its M/T ratio further increased after AMPA agonist administration [T-GluR1 protein (T-GluR1/ β -actin): 2.41 ± 0.29 vs. 1.72 ± 0.11 , M-GluR1 protein (M-GluR1/ β -actin): 1.18 ± 0.15 vs. 0.79 ± 0.09 , M/T ratio: 0.78 ± 0.12 vs. 0.46 ± 0.08 , all $P < 0.01$], GluR2 expression was significantly increased [T-GluR2 protein (T-GluR2/ β -actin): 0.65 ± 0.13 vs. 0.30 ± 0.14 , $P < 0.01$; M-GluR2 protein (M-GluR2/ β -actin): 0.17 ± 0.05 vs. 0.13 ± 0.07 , $P > 0.05$], but its M/T ratio was further decreased (0.27 ± 0.10 vs. 0.41 ± 0.08 , $P < 0.05$). The ATP-related enzyme activity was further decreased, and the ATP content was further decreased ($\mu\text{mol/g}$: 0.32 ± 0.07 vs. 0.70 ± 0.10 , $P < 0.01$). Mitochondria DRP-1 expression and its phosphorylation were further increased [DRP-1 protein (DRP-1/GAPDH): 2.75 ± 0.36 vs. 1.70 ± 0.19 , p-DRP-1 protein (p-DRP-1/GAPDH): 0.99 ± 0.14 vs. 0.76 ± 0.15 , both $P < 0.05$], and Mfn2 expression was further decreased (Mfn2/GAPDH: 0.23 ± 0.12 vs. 0.54 ± 0.12 , $P < 0.05$). This indicated that the AMPA agonist increased the expression of the AMPA receptor GluR1 subunit on the cell membrane and shifted the GluR2 into the cell, thus increasing the mitochondrial injury caused by propofol. Compared with the propofol group, the GluR1 expression and its M/T ratio decreased significantly after AMPA inhibitor administration [T-GluR1 protein (T-GluR1/ β -actin): 0.99 ± 0.14 vs. 1.72 ± 0.11 , M-GluR1 protein (M-GluR1/ β -actin): 0.21 ± 0.07 vs. 0.79 ± 0.09 , M/T ratio: 0.21 ± 0.07 vs. 0.46 ± 0.08 , all $P < 0.01$], the change of GluR2 expression was not significant, but its M/T ratio was significantly increased (0.59 ± 0.09 vs. 0.41 ± 0.08 , $P < 0.05$). The ATP-related enzyme activity was increased significantly, and the ATP content was increased significantly ($\mu\text{mol/g}$: 0.87 ± 0.12 vs. 0.70 ± 0.10 , $P < 0.05$). Mitochondria DRP-1 expression and its phosphorylation were significantly decreased [DRP-1 protein (DRP-1/GAPDH): 1.18 ± 0.17 vs. 1.70 ± 0.19 , p-DRP-1 protein (p-DRP-1/GAPDH): 0.37 ± 0.10 vs. 0.76 ± 0.10 , both $P < 0.05$], and Mfn2 expression was significantly increased (Mfn2/GAPDH: 0.78 ± 0.10 vs. 0.54 ± 0.12 , $P < 0.05$). This indicated that AMPA inhibitor promoted the movement to the cell membrane of GluR2 subunits meanwhile inhibited the expression of GluR1 subunits, thus alleviating the injury of mitochondria caused by propofol in the brain. **Conclusions** Repeated intraperitoneal injection of 30 mg/kg propofol for 3 days can increase the expression of GluR1 subunits of AMPA receptor in 7-day neonatal rats hippocampus mainly distributing in the cell membrane, decrease the expression of GluR2 subunits moving into the cell, thus causing injury of mitochondrial function and dynamics, which can be aggravated by AMPA receptor agonist and alleviated by AMPA receptor inhibitors.

【Key words】 Propofol; AMPA receptor; Mitochondria; Neonate rat

【Fund program】 Tianjin Municipal Science and Technology Planning Project (20JCQNJC01050); Tianjin Municipal Education Commission Scientific Research Program (2019KJ201)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210926-01402

每年接受手术的婴幼儿患者数量庞大,对于正在发育的大脑,麻醉因素诱导的神经毒性是医患双方持续担忧的问题。线粒体是保证细胞能量供应的主要场所,线粒体异常也是丙泊酚导致的幼稚神经系统损伤的可能机制^[1-2],但导致线粒体异常的机制尚不明确。本课题组前期实验结果显示,丙泊酚会对新生大鼠海马 AMPA 受体〔一种兴奋性氨基酸 (excitatory amino acid, EAA) 受体〕亚单位造成影响,使谷氨酸受体 1 (glutamate receptor 1, GluR1) 亚单位表达升高, GluR2 表达下降^[3]。AMPA 受体的结构变化会影响其对 Ca^{2+} 的通透性^[4];而细胞内 Ca^{2+} 的变化又会导致线粒体损伤^[1]。我们推测 AMPA 受体亚单位变化会造成细胞内线粒体损伤。因此,本实

验旨在通过应用 AMPA 受体的激动剂和抑制剂探讨 AMPA 受体改变与线粒体损伤之间的关系,进一步分析丙泊酚的脑损伤机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:健康 7 日龄 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 14 ~ 18 g,动物及饲料均由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物许可证号:SYXK(津)2019-0004。

1.2 动物分组及处理方法:按照随机数字表法将大鼠分为对照组、丙泊酚组、丙泊酚+AMPA 受体激动剂 AMPA 组(丙泊酚+AMPA 组)及丙泊酚+AMPA 受体抑制剂 CNQX 组(丙泊酚+CNQX 组),每组 12 只。各组幼鼠处理前禁食、水 2 h。丙泊酚各组腹腔注射

30 mg/kg 丙泊酚(意大利阿斯利康公司),对照组则注射生理盐水 3 mg/kg;首次给药后每隔 20 min 给予首剂量的 1/2,每日 3 次,待幼鼠翻正反射恢复正常后与母鼠共同饲养,自由哺乳。将实验室的温度维持在 25~28 °C,直肠温度维持在(37.0±0.5)°C,连续注射 3 d。丙泊酚+AMPA 组首次给药后经左侧脑室注射 1 g/L 的 AMPA(美国 Sigma 公司),进针点定位在后囟前 2 mm、正中侧方 1.5 mm 处,用 5 μL 的微量注射器垂直刺入,深度为 2 mm,注药速度维持在 2~3 μL/min,共注射 5 μL;丙泊酚+CNQX 组经左侧脑室注射 1 g/L 的 CNQX(美国 Sigma 公司),给药方式及剂量同丙泊酚+AMPA 组。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并通过天津医科大学总医院实验动物福利伦理委员会审批(审批号:IRB2021-DW-35)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)测定 AMPA 受体亚单位及线粒体动力学相关蛋白表达: 各组给药 3 d 后取 6 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉后断头取脑,冰上分离双侧海马组织,细胞裂解液裂解组织提取总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量;同时提取膜蛋白。加入 0.01% 溴酚蓝,煮沸变性;采用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白质,转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h 后,用含吐温 20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)漂洗 3 次;分别加入兔抗 GluR1 一抗(1:2000)和小鼠抗 GluR2 一抗(1:1000,美国 Cell Signaling 公司),小鼠抗线粒体动力相关蛋白-1(dynamin-related protein-1, DRP-1)一抗(1:1000)、兔抗线粒体融合蛋白 2(mitofusin 2, Mfn2)一抗(1:1000)和兔抗磷酸化 DRP-1(phosphorylated DRP-1, p-DRP-1)一抗(1:1000,美国 BD 公司),β-肌动蛋白(β-actin)一抗(1:5000)和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(1:5000,英国 Abcam 公司),4 °C 孵育过夜,DRP-1、p-DRP-1 及 Mfn2 仅测定总蛋白含量;用 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,分别用羊抗兔(1:5000)和兔抗鼠二抗(1:6000)室温孵育 1 h,行电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)显色。采用 Gene Tool 软件测定条带灰度值,分别以 DRP-1、p-DRP-1、Mfn2 灰度值

与 GAPDH 灰度值的比值,以及 GluR1、GluR2 灰度值与 β-actin 灰度值的比值来描述 Western blotting 检测结果,以反映目标蛋白的表达情况,针对同一样本计算膜蛋白与总蛋白比值(membranous protein/total protein, M/T)。

1.3.2 三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)含量及 ATP 酶活性测定: 各组给药 3 d 后另取 6 只大鼠,麻醉后断头取海马组织,冰上匀浆,制备 10% 脑组织匀浆;4 °C 低温离心 5 min,取上清液;4 °C 离心,取沉淀,即获得海马线粒体。经过超声波破碎后,测定 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶活性,以每小时每毫克蛋白分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量作为 1 个活性单位(μmol·mg⁻¹·h⁻¹);ATP 酶活性=(测定 A 值-对照 A 值)/标准 A 值×标准品浓度×反应体系中样本稀释倍数×6/待测样本蛋白浓度。采用比色法,通过紫外可见分光光度计测定 ATP 含量。

1.4 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,如方差齐则采用 LSD 检验,如方差不齐则采用 Dunnett T3 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组海马组织中 AMPA 受体亚单位的蛋白表达比较(表 1): Western blotting 检测结果显示,与对照组相比,丙泊酚组新生大鼠海马组织中 GluR1 亚单位的总蛋白(total GluR1, T-GluR1)、GluR1 膜蛋白(membranous GluR1, M-GluR1)表达量均明显升高,且 M/T 比值亦明显升高(均 $P<0.01$);加入 AMPA 受体激动剂后, T-GluR1、M-GluR1 表达量及 M/T 比值均较丙泊酚组进一步升高(均 $P<0.01$);而加入 AMPA 受体抑制剂后, T-GluR1、M-GluR1 表达量及 M/T 比值则均较丙泊酚组明显降低(均 $P<0.01$)。

与对照组相比,丙泊酚组新生大鼠海马组织中 T-GluR2、M-GluR2 表达量均明显降低(均 $P<0.01$),且 M/T 比值亦明显降低($P<0.05$);加入 AMPA 受体激动剂后, T-GluR2 的表达量较丙泊酚组进一步升高($P<0.01$), M-GluR2 表达量也呈上升趋势但差异并无统计学意义($P>0.05$), M/T 比值则较丙泊酚组明显降低($P<0.05$);而加入 AMPA 受体抑制剂后, T-GluR2、M-GluR2 的表达量均较丙泊酚组略有降低(均 $P>0.05$),但其 M/T 比值则较丙泊酚组明显升高($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠海马组织中 AMPA 受体亚单位表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	GluR1 亚单位			GluR2 亚单位		
		T-GluR1 蛋白 (T-GluR1/ β -actin)	M-GluR1 (M-GluR1/ β -actin)	M/T 比值	T-GluR2 蛋白 (T-GluR2/ β -actin)	M-GluR2 (M-GluR2/ β -actin)	M/T 比值
对照组	6	0.69 ± 0.18	0.12 ± 0.05	0.19 ± 0.11	0.76 ± 0.17	0.40 ± 0.05	0.60 ± 0.01
丙泊酚组	6	1.72 ± 0.11 ^a	0.79 ± 0.09 ^a	0.46 ± 0.08 ^a	0.30 ± 0.14 ^a	0.13 ± 0.07 ^a	0.41 ± 0.08 ^b
丙泊酚+AMPA 组	6	2.41 ± 0.29 ^c	1.18 ± 0.15 ^c	0.78 ± 0.12 ^c	0.65 ± 0.13 ^c	0.17 ± 0.05	0.27 ± 0.10 ^d
丙泊酚+CNQX 组	6	0.99 ± 0.14 ^c	0.21 ± 0.07 ^c	0.21 ± 0.07 ^c	0.21 ± 0.07	0.09 ± 0.01	0.59 ± 0.09 ^d

注: AMPA 为 AMPA 受体(一种兴奋性氨基酸受体)激动剂, CNQX 为 AMPA 受体抑制剂, GluR 为谷氨酸受体, T 为总蛋白, M 为膜蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与丙泊酚组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

2.2 各组海马组织中 ATP 含量及 ATP 相关酶活性的比较 (表 2): 与对照组相比, 丙泊酚处理后新生大鼠海马组织中 ATP 含量和 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶活性均明显下降 (均 $P < 0.05$); 加入 AMPA 受体激动剂后, ATP 含量和 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶活性均较丙泊酚组进一步下降 (均 $P < 0.05$); 而加入 AMPA 受体抑制剂后, ATP 含量及 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶活性均较丙泊酚组明显升高 (均 $P < 0.05$)。

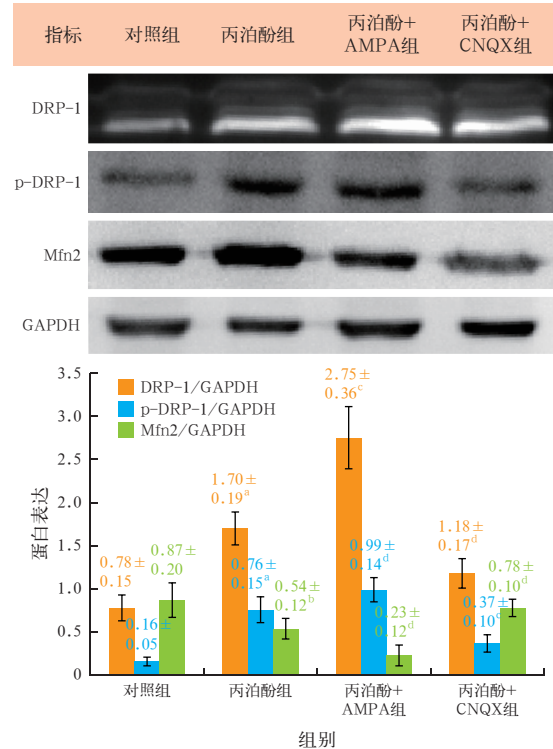
表 2 各组大鼠海马组织中中线粒体 ATP 含量及 ATP 相关酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	ATP ($\mu\text{mol/g}$)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
对照组	6	0.92 ± 0.07	7.50 ± 0.92
丙泊酚组	6	0.70 ± 0.10 ^a	3.02 ± 0.41 ^b
丙泊酚+AMPA 组	6	0.32 ± 0.07 ^c	1.55 ± 0.65 ^d
丙泊酚+CNQX 组	6	0.87 ± 0.12 ^d	5.13 ± 0.43 ^c

组别	动物数 (只)	Ca ²⁺ -ATP 酶 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Mg ²⁺ -ATP 酶 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
对照组	6	5.20 ± 1.29	4.14 ± 0.56
丙泊酚组	6	2.56 ± 1.01 ^b	2.16 ± 0.84 ^b
丙泊酚+AMPA 组	6	0.98 ± 0.64 ^d	1.11 ± 0.54 ^d
丙泊酚+CNQX 组	6	4.01 ± 1.12 ^d	3.54 ± 0.93 ^d

注: AMPA 为 AMPA 受体(一种兴奋性氨基酸受体)激动剂, CNQX 为 AMPA 受体抑制剂, ATP 为三磷酸腺苷; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与丙泊酚组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

2.3 各组海马组织中线粒体动力学相关蛋白的表达比较 (图 1): Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, 丙泊酚组新生大鼠海马组织中 DRP-1 的表达量及其磷酸化水平均明显升高, 而 Mfn2 的表达量则明显下降 (均 $P < 0.05$); 加入 AMPA 受体激动剂后, DRP-1 的表达量及其磷酸化水平均较丙泊酚组进一步升高, Mfn2 的表达量则较丙泊酚组进一步下降 (均 $P < 0.05$); 而加入 AMPA 受体抑制剂后, DRP-1 的表达量及其磷酸化水平均较丙泊酚组明显下降, 而 Mfn2 的表达量则较丙泊酚组明显升高 (均 $P < 0.05$)。



AMPA 为 AMPA 受体(一种兴奋性氨基酸受体)激动剂, CNQX 为 AMPA 受体抑制剂, DRP-1 为线粒体动力相关蛋白-1, p-DRP-1 为磷酸化 DRP-1, Mfn2 为线粒体融合蛋白 2, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与丙泊酚组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

图 1 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组大鼠海马组织中线粒体动力学相关蛋白表达

3 讨论

AMPA 受体是一种 EAA 受体^[4], 激活后可以介导兴奋性突触后电流, 与突触的可塑性及学习和记忆能力有关^[5], 而 AMPA 受体过度激活则可以导致多种急性神经损伤。本课题组前期实验表明, 丙泊酚 (20 mg · kg⁻¹ · h⁻¹) 可减少脑缺血后大鼠神经元凋亡, 并且逆转缺血造成的认知功能损伤; 同时, 这一保护作用与磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 诱导的 AMPA 受体 GluR2 亚单位在神经元细胞膜的持续表达及向神经元细胞表面移动有关^[6]。但是, 越来越多的动物实验及细胞实验均提

示,丙泊酚对幼稚中枢神经系统存在损伤作用^[7-8],损伤机制尚不明确。基于AMPA受体在成熟大脑和幼稚大脑中的表达分布不同,以及AMPA受体对细胞Ca²⁺通透性的控制作用,本课题组推测丙泊酚对幼稚神经系统的损伤作用可能也与AMPA受体导致的Ca²⁺内流并且造成线粒体损伤有关。

AMPA受体是由4个亚基(GluR1~GluR4)组成的两个二聚体构成,调控AMPA受体对Ca²⁺通透性的主要为GluR1及GluR2亚单位;其中,含有GluR1的AMPA受体对Ca²⁺具有高通透性^[4],含有GluR2的AMPA受体则对Ca²⁺的通透性极低。Na⁺、Ca²⁺通透性增加可造成渗透性损伤及兴奋性毒性。本实验表明,反复多次腹腔注射30 mg/kg丙泊酚会导致新生大鼠海马AMPA受体GluR1总量升高,且膜上GluR1表达量亦上升,而GluR2的总量及膜上表达量则降低,这一改变会导致Ca²⁺内流,造成神经细胞损伤。当加入AMPA受体激动剂后,上述变化更加明显;而加入AMPA受体抑制剂后,GluR1、GluR2的总量及膜上表达量均下降,但GluR2的M/T比值明显升高,同时线粒体损伤得以缓解。说明AMPA受体激动剂和抑制剂不仅影响了亚单位的表达量,还影响了其分布过程。也就是说,在丙泊酚导致脑损伤的过程中,不仅有AMPA受体含量的改变,其定位和转运也出现了变化。

有假说提出,长时程增强(long-term potentiation, LTP)期间缺乏GluR2的AMPA受体可能通过周围其他突触后膜转移而来。突触和突触外AMPA受体也可以通过外吞补充,提供足够多的受体参与构成转运^[9],而不仅仅是表达含量的变化。AMPA为谷氨酸类似物,是一种有效的选择性兴奋性神经递质L-谷氨酸激动剂。本实验显示,给予AMPA受体激动剂后,GluR1和GluR2的表达量均呈上升趋势;但两种亚单位的M/T比值变化趋势相反,其中GluR1的M/T比值上升,而GluR2的M/T比值则下降。同理,当给予AMPA受体抑制剂后,GluR1和GluR2的表达量均下降;但两种亚单位的M/T比值变化趋势相反,其中GluR1的M/T比值下降,而GluR2的M/T比值上升。因此我们推测,AMPA受体的组成分布是一个动态过程,当丙泊酚作用于新生大鼠时,含有GluR1的AMPA受体表达升高且主要向细胞膜移动,而含有GluR2的AMPA受体向细胞内移动,不仅影响了AMPA受体总量的表达,而且改变了其构成和分布,使含有GluR2的AMPA受体向细胞膜移动,

在一定程度上阻止了Ca²⁺内流,从而对神经细胞起到保护作用。

线粒体是细胞内能量转换场所,并且具有参与细胞增殖分化、信息传递、维持神经元存活和突触可塑性等功能,也是脑损伤极易累及的细胞器^[1]。丙泊酚对幼稚神经细胞线粒体的损伤可能是其导致小儿神经系统损伤及学习能力下降的原因之一^[2]。有实验显示,丙泊酚对幼稚神经元的损伤作用主要是引起线粒体的异常分裂和融合^[10]。因此,本实验通过观察丙泊酚对新生大鼠海马线粒体的影响来探讨丙泊酚的损伤机制。

线粒体受到损伤后,其最明显的表现为产能作用受到影响。与此同时,当线粒体结构受损时,除了影响ATP的合成,还会导致ATP能量依赖性酶活性改变^[11],包括Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶、Mg²⁺-ATP酶等。酶活性降低会引发钙超载,影响细胞氧化磷酸化功能,进一步抑制ATP合成,形成“ATP合成障碍-钙超载”的恶性循环,加重脑损伤^[12]。本实验显示,反复多次腹腔注射30 mg/kg丙泊酚连续3 d的新生大鼠海马线粒体ATP含量明显下降,Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶、Mg²⁺-ATP酶活性明显降低。证明丙泊酚对新生大鼠海马造成损伤,这一损伤体现在对神经元线粒体的影响,使其ATP产生下降,ATP相关酶活性受到抑制。大脑的耗氧量高,当能量产生受到影响时,大脑正常功能极易受到损伤,发育期大脑更是如此。本实验表明,给予AMPA受体激动剂后,丙泊酚造成的上述损伤进一步加重,而AMPA受体抑制剂则可以减轻损伤程度。证明AMPA受体的表达和分布影响了神经细胞线粒体的功能,包括ATP的合成及ATP依赖酶活性的变化,由此导致幼稚神经细胞损伤。

本实验还表明,丙泊酚不仅对线粒体功能造成影响,同样也导致了线粒体动力的改变。细胞内的线粒体处于不断分裂、融合的状态,这种动态变化称为线粒体动力学^[13]。幼稚神经系统线粒体动力学损伤会对大脑的发育及后期学习记忆能力产生不良影响,异常的线粒体动力学也参与了很多中枢神经系统疾病及神经退行性变^[14-15],线粒体动力学异常可导致患者长期认知功能障碍。线粒体的分裂和融合通过一些蛋白进行调控,因此本实验中也测定了线粒体动力学相关蛋白表达,包括Mfn2、DRP-1、p-DRP-1。

Mfn2位于线粒体外膜,可以促进线粒体外膜融

合^[16]。同时, Mfn2 也参与了线粒体自噬、胰岛素抵抗, 还可以抑制肿瘤细胞, 参与内质网应激调控等。本实验显示, 反复多次腹腔注射 30 mg/kg 丙泊酚后, 新生大鼠海马 Mfn2 表达明显下降, 说明丙泊酚可以导致新生大鼠海马线粒体动力学异常, 线粒体融合障碍; 给予 AMPA 受体激动剂后, Mfn2 表达的下降趋势进一步加重, 而 AMPA 受体抑制剂则可以减轻 Mfn2 的表达下降。说明 AMPA 受体的表达影响了 Mfn2 的表达。

线粒体分裂受 DRP-1 的调节^[16]。当线粒体分裂时, DRP-1 由胞质移至外膜, 促进线粒体分裂, 与此同时也促进了线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放^[17]。本实验通过 Western blotting 测定了 DRP-1 的表达, 发现反复多次腹腔注射 30 mg/kg 丙泊酚后, 新生大鼠海马组织中 DRP-1 表达升高, AMPA 受体激动剂能加重这一过程, 而 AMPA 受体抑制剂则能降低 DRP-1 的表达。DRP-1 的活性和功能受到翻译后修饰的调节, 研究比较多的是磷酸化修饰, DRP-1 丝氨酸 637 位点的磷酸化可以导致 DRP-1 向线粒体转移, 促进线粒体分裂, 加重线粒体损伤^[18]。本实验显示, 反复多次腹腔注射 30 mg/kg 丙泊酚导致新生大鼠海马 p-DRP-1 表达也升高, 线粒体呈现异常的分裂状态增多, 融合状态减少, 说明丙泊酚促进了线粒体分裂, 影响了线粒体的稳定性, 同时影响了其正常功能; 同样, AMPA 受体激动剂可进一步加重上述变化, 而 AMPA 受体抑制剂则可抑制上述过程, 说明 AMPA 受体同样影响了线粒体分裂。

4 结论

反复多次腹腔注射 30 mg/kg 丙泊酚连续 3 d, 可导致新生大鼠海马 AMPA 受体 GluR1 亚单位表达升高且主要分布于细胞膜, GluR2 亚单位表达降低且主要分布于细胞内, 线粒体产生 ATP 减少, 且 ATP 相关酶活性降低, 线粒体融合相关蛋白 Mfn2 表达降低, 线粒体分裂相关蛋白 DRP-1、p-DRP-1 表达升高。AMPA 受体激动剂可以通过升高 GluR1 亚单位表达并促使其向细胞膜上移动, 减少 GluR2 在细胞膜上的分布, 从而加重线粒体损伤, 同时引起 Mfn2 降低及 DRP-1、p-DRP-1 升高; AMPA 受体抑制剂则可降低 GluR1 亚单位在细胞膜上的表达并促进 GluR2 向细胞膜移动, 从而减轻线粒体损伤, 同时使线粒体趋于稳定融合状态。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭涛, 芮庆林, 蔡蕊. 中药红景天和血必净对心肺复苏后大鼠脑线粒体功能的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (6): 640-643. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.06.021.
- [2] Twaroski DM, Yan YS, Zaja I, et al. Altered mitochondrial dynamics contributes to propofol-induced cell death in human stem cell-derived neurons [J]. Anesthesiology, 2015, 123 (5): 1067-1083. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000857.
- [3] 王晨旭, 周琰, 元元, 等. 丙泊酚对新生大鼠海马 AMPA 受体表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2021, 41 (12): 1458-1462. DOI: 10.3760/cma.j.cn131073.20211023.01212.
- [4] Benke T, Traynelis SF. AMPA-type glutamate receptor conductance changes and plasticity: still a lot of noise [J]. Neurochem Res, 2019, 44 (3): 539-548. DOI: 10.1007/s11064-018-2491-1.
- [5] Wu D, Bacaj T, Morishita W, et al. Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP [J]. Nature, 2017, 544 (7650): 316-321. DOI: 10.1038/nature21720.
- [6] Wang CX, Wei Y, Yuan Y, et al. The role of PI3K-mediated AMPA receptor changes in post-conditioning of propofol in brain protection [J]. BMC Neurosci, 2019, 20 (1): 51. DOI: 10.1186/s12868-019-0532-6.
- [7] McCann ME, Soriano SG. Does general anesthesia affect neurodevelopment in infants and children? [J]. BMJ, 2019, 367: l6459. DOI: 10.1136/bmj.l6459.
- [8] Sun WC, Pei L. Dexmedetomidine attenuates propofol-induced apoptosis of neonatal hippocampal astrocytes by inhibiting the Bel21 signalling pathway [J]. Eur J Neurosci, 2021, 54 (11): 7775-7789. DOI: 10.1111/ejn.15517.
- [9] Yao YD, Kelly MT, Sajikumar S, et al. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors [J]. J Neurosci, 2008, 28 (31): 7820-7827. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0223-08.2008.
- [10] Liu YN, Yan YS, Inagaki Y, et al. Insufficient astrocyte-derived brain-derived neurotrophic factor contributes to propofol-induced neuron death through Akt/glycogen synthase kinase 3 β /mitochondrial fission pathway [J]. Anesth Analg, 2017, 125 (1): 241-254. DOI: 10.1213/ANE.0000000000002137.
- [11] 徐艳, 陈婵, 姜春玲, 等. 围手术期神经认知障碍的炎症机制及治疗进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (12): 1559-1562. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.12.028.
- [12] 郭艺, 蒋莉, 苑爱云, 等. 惊厥持续时间对惊厥后海马神经元凋亡及其对早期事件变化的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19 (6): 343-345. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2007.06.008.
- [13] 李毅, 王鹏, 林嘉莉, 等. 线粒体分裂抑制剂对心肺复苏后脑功能及神经元凋亡的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (12): 950-954. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.12.002.
- [14] Oliver D, Reddy PH. Dynamics of dynamin-related protein 1 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases [J]. Cells, 2019, 8 (9): 961. DOI: 10.3390/cells8090961.
- [15] Milani M, Beckett AJ, Al-Zeebeby A, et al. DRP-1 functions independently of mitochondrial structural perturbations to facilitate BH3 mimetic-mediated apoptosis [J]. Cell Death Discov, 2019, 5: 117. DOI: 10.1038/s41420-019-0199-x.
- [16] Chandhok G, Lazarou M, Neumann B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018, 93 (2): 933-949. DOI: 10.1111/bry.12378.
- [17] Alaimo A, Gorjod RM, Beauquis J, et al. Deregulation of mitochondria-shaping proteins Opa-1 and Drp-1 in manganese-induced apoptosis [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): e91848. DOI: 10.1371/journal.pone.0091848.
- [18] 肖雯, 蒋宇, 邹联洪, 等. 线粒体介导心肌细胞损伤在急性心肌梗死合并心源性休克中的作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (7): 885-889. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200108-00120.

(收稿日期: 2021-09-26)