

· 论 著 ·

丙泊酚对帕金森小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡的影响

余志阳¹, 潘士勇², 刘清珍¹, 刘 健¹, 陈春龙¹, 李伟彦¹, 朱四海¹

[摘要] **目的** 观察丙泊酚对帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡及半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、Bcl-2 蛋白表达的影响。**方法** 雄性 C57BL6 小鼠 48 只,随机分为等渗盐水对照组、PD 模型组、PD 模型 + 2 h 脂肪乳组、PD 模型 + 24 h 脂肪乳组、PD 模型 + 2 h 丙泊酚组、PD 模型 + 24 h 丙泊酚组。腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)30 mg/kg,连续 5 d,建立小鼠 PD 模型。最后一次注射 MPTP 后分别于 2 h、24 h 腹腔注射脂肪乳(10 mL/kg)或丙泊酚(100 mg/kg)。最后一次腹腔注射药物后 12 h 后处死小鼠取中脑黑质区。采用免疫组化方法观察黑质区神经元凋亡情况,采用免疫蛋白印迹法检测 Caspase-3、Bcl-2 蛋白的表达水平。**结果** 与对照组比较,PD 组模型及脂肪乳组,小鼠的黑质神经元凋亡细胞均明显增加,同时凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达明显升高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平明显下降。与脂肪乳组相比,丙泊酚组小鼠的黑质神经元凋亡细胞均明显减少,同时凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达水平明显减低,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平明显上升,且分子表达改变在模型建立 24 h 后给予丙泊酚更显著。**结论** 丙泊酚能减少 PD 小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡,同时上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,下调促凋亡蛋白 Caspase-3 蛋白的表达,丙泊酚通过调控凋亡相关蛋白表达水平产生脑保护作用。

[关键词] 帕金森病;凋亡;丙泊酚;半胱氨酸蛋白酶-3;Bcl-2

[中图分类号] R742.5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.04.003

The effect of propofol on apoptosis of dopaminergic neurons in the substantia nigra of mouse model of Parkinson's disease

YU Zhi-yang¹, PAN Shi-Yong², LIU Qing-zhen¹, LIU Jian¹, CHEN Chun-long¹, LI Wei-yan¹, ZHU Si-hai¹. 1. Department of Anesthesiology, 2. Department of Ranking Health Protection, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of propofol on neuronal apoptosis and expression of Caspase-3 and Bcl-2 protein in the substantia nigra of mouse model of Parkinson's disease. **Methods** A total of forty eight male C57BL6 mice were randomly assigned to six groups: group I control, the remaining five groups were firstly to establish mouse model of Parkinson's disease (PD) with intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) 30 mg/kg for five consecutive days. Intralipos (10 mL/kg) or propofol (100 mg/kg) was respectively administered intraperitoneal injection in 2 h or 24 h after establishment of PD. The mice were sacrificed to take the substantia nigra after the last 12 h intraperitoneal injection of drugs. Apoptosis was observed in substantia nigra with immunohistochemistry, and the expression of Bcl-2 and protein ystiene proteinase-3 were tested with Western blot. **Results** Compared with the mice in control group, the mice in PD group and intralipos group of apoptosis neurons were significantly increased in substantia nigra of mice, while the expression of protein Caspase-3 was increased significantly and the levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased obviously. The mice in propofol groups of apoptosis neurons were significantly decreased, compared with the mice in intralipos groups, however, expression of protein Caspase-3 apoptosis related was decreased significantly and the levels of the antiapoptotic protein Bcl-2 increased obviously, and the change of molecular expression was more significant in 24 h when the propofol was administered after establishment of PD model. **Conclusion** Propofol can reduce apoptosis in dopaminergic neurons PD of substantia nigra in PD mice, and upgrade expression of antiapoptotic protein Bcl-2, downgrade expression of apoptosis protein Caspase 3. Expression level of proteins apoptosis related was regulated to produce cerebral protection by propofol.

[Key words] Parkinson's disease; apoptosis; propofol; cysteine protease-3; Bcl-2

基金项目: 南京军区面上课题(12MA091);南京军区南京总医院面上课题(2013026)

作者单位: 210002 江苏南京,南京军区南京总医院,1. 麻醉科,2. 干部保健科

通讯作者: 朱四海, E-mail: njzy305@sina.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以中脑黑质多巴胺能神经元进行性变性、缺失,导致黑质纹状体多巴胺能神经系统失调而引发的中枢神经系统退行性疾病^[1]。PD 的发病机理复杂,“氧化应激学说”得到公认,即自由基通过氧化神经膜类脂、破坏

多巴胺能神经元膜功能或直接破坏细胞 DNA,最终导致多巴胺能神经元的凋亡^[2-3]。目前丙泊酚脑保护研究多限于缺血再灌注后或缺血再灌注预处理方面^[4-5],而关于丙泊酚对 PD 患者多巴胺能神经元凋亡的影响较少研究。本研究通过小鼠腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)构建 PD 模型、丙泊酚干预、检测黑质中相关蛋白表达水平,测定凋亡细胞,探讨丙泊酚对 PD 小鼠多巴胺能神经元凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 经南京军区南京总医院动物医学伦理会批准,健康雄性 C57BL6 小鼠 48 只,体重 25 ~ 30 g,出生 36 ~ 40 周,由南京军区南京总医院动物实验中心提供。饲养条件:维持室温(25 ± 2)℃,人工昼夜循环光照节律(12 ~ 12 h),自由进食及饮水。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备 C57BL6 雄性小鼠 48 只,实验动物随机分为 6 组。I 组(*n* = 8):腹腔注射等渗盐水 3 mL/kg,1 次/d,连续 5 d。II 组(*n* = 8):腹腔注射 MPTP(Sigma, USA) 30 mg/kg,1 次/d,连续 5 d。III 组(*n* = 8):最后一次注射 MPTP 后 2 h,腹腔注射脂肪乳(Sino-Swed Pharmaceutical Corp, China) 10 mL/kg。IV 组(*n* = 8):最后一次注射 MPTP 后 24 h,腹腔注射脂肪乳 10 mL/kg。V 组(*n* = 8):最后一次注射 MPTP 后 2 h 腹腔注射丙泊酚(Astrazeneca, Italy) 100 mg/kg。VI 组(*n* = 8):最后一次注射 MPTP 后 24 h 腹腔注射丙泊酚 100 mg/kg。

1.2.2 标本采集 最后一次腹腔注射药物后 12 h 将每组 4 只小鼠麻醉,经左心室等渗盐水灌洗后,再用含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液(PBS)灌注固定,迅速开颅取脑。石蜡包埋,切取中脑黑质区,切片厚度为 5 μm。

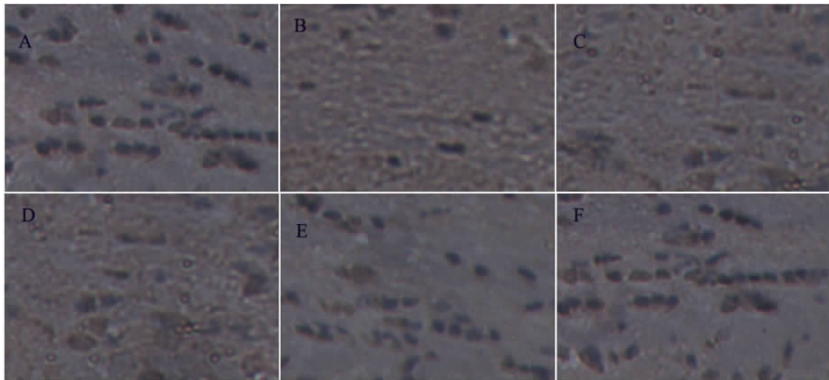
1.2.3 免疫组化染色 每组小鼠中随机取 4 只进行免疫组化染色。切片脱蜡后,用 TBS(pH 7.4)洗 3 次,每次 10 min。切片进行水浴法抗原修复后降至室温;TBS 洗 3 次,每次 10 min;加 H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,TBS 洗 3 次,每次 10 min。分别采用兔抗小鼠 Bcl-2、Caspase-3 多克隆抗体(1:200, Cell Signaling Technology, USA) 加入稀释的羊抗兔 IgG-HRP,室温温育 1 h, PBS(pH 7.4)漂洗 5 min,共 3 次。滴加 DAB 显色液显色 10 min,蒸馏水冲洗、复染、脱水、封片。

1.2.4 免疫蛋白印迹(Western blot) 每组剩余 4 只小鼠进行免疫蛋白印迹分析。小鼠麻醉后取中脑黑质部分,置入组织蛋白提取液中,低温匀浆,取出上清液。蛋白定量后取 30 μg 样品,经 8% SDS 凝胶电泳后,转移至硝酸纤维膜上,室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,取相应条带分别加入 Bcl-2 兔抗小鼠一抗(1:1000, Cell Signaling Technology, USA), Caspase-3 兔抗小鼠一抗(1:1000, Cell Signaling Technology, USA), 4℃ 孵育过夜, TBST 清洗 3 次,每次 5 min, 加 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:1000, Sigma, USA), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。暗室内加 ECL 显影液显色曝光,扫描。内参为 β-actin(1:1000, Cell Signaling Technology, USA)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

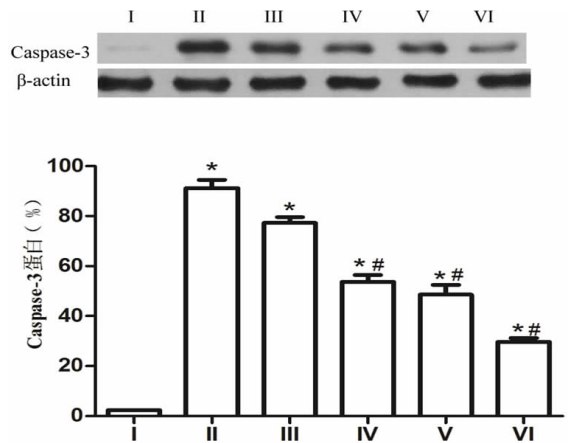
2.1 免疫组化 I 组小鼠黑质可见大量神经元(图 1A),排列整齐呈条带状。II 组和对照组比较,黑质区神经元明显减少(图 1B)。V、VI 组与 II 组比较,神经元明显增多(图 1B、E、F),但 III、IV 组与 II 组比较,黑质区神经元减少无差异(图 1B、C、D)。



A:等渗盐水对照组;B:PD 模型组;C:脂肪乳 2 h 干预组;D:脂肪乳 24 h 干预组;E:丙泊酚 2 h 干预组;F:丙泊酚 24 h 干预组

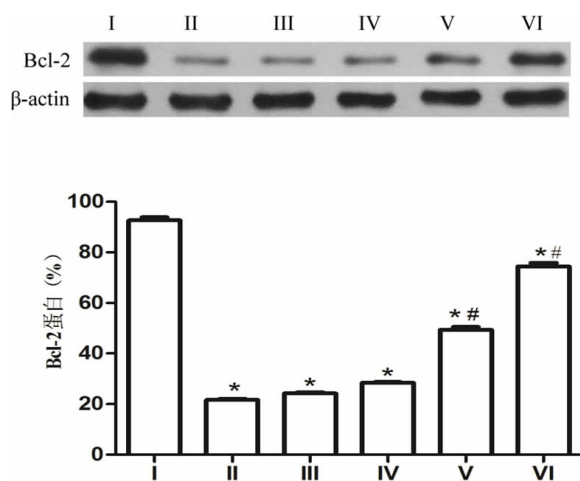
图 1 6 组小鼠黑质区多巴胺能神经元免疫组化染色结果(×200)

2.2 Western blot 检测 PD 模型组小鼠黑质区 Caspase-3 蛋白含量最高(图 2)。丙泊酚 24 h 干预组小鼠黑质区 Bcl-2 蛋白的含量最高(图 3)。



I: 等渗盐水对照组; II: PD 模型组; III: 脂肪乳 2 h 干预组; IV: 脂肪乳 24 h 干预组; V: 丙泊酚 2 h 干预组; VI: 丙泊酚 24 h 干预组。与 I 组比较, * $P < 0.05$; 与 II 组比较, # $P < 0.05$

图 2 6 组小鼠黑质区 Caspase-3 蛋白的含量



I: 等渗盐水对照组; II: PD 模型组; III: 脂肪乳 2 h 干预组; IV: 脂肪乳 24 h 干预组; V: 丙泊酚 2 h 干预组; VI: 丙泊酚 24 h 干预组。与 I 组比较, * $P < 0.05$; 与 II 组比较, # $P < 0.05$

图 3 6 组小鼠黑质区 Bcl-2 蛋白的含量

3 讨论

PD 是发生于中年以上的中枢神经系统进行性退行性疾病,其主要病理改变为黑质致密部多巴胺能神经元变性和坏死,流行病学研究显示该病为老年性痴呆 (Alzheimer's disease) 以外第二多见的神经退行性病变^[6]。随着人口老年化,接受外科手术

的老年患者逐年增加,这意味着越来越多的 PD 患者亦接受手术麻醉。为了选择有利于 PD 患者的麻醉药物,本研究探讨了常用的静脉麻醉药丙泊酚对 PD 模型小鼠黑质神经元凋亡的影响,发现①丙泊酚减轻 MPTP 诱导帕金森小鼠黑质区组织学的改变,减少凋亡细胞的产生;②丙泊酚可抑制帕金森小鼠黑质凋亡蛋白 Caspase-3 的表达,同时上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。

PD 发病机制至今尚未完全阐明,普遍认为线粒体 DNA 的突变和氧化应激是主要致病因素^[7]。MPTP 可成功诱导小鼠 PD 模型^[8],其机理可能为氧化应激造成的线粒体复合酶的功能抑制^[2],引起细胞色素 C 释放,激活 Caspase-3 引起凋亡的产生^[9-10]。Caspase-3 和 Bcl-2 在细胞凋亡过程中起主要作用, Bcl-2 和前凋亡蛋白 Bax 聚合为复合体,降低 Bax 活性,抑制凋亡的发生^[11-12]。研究表明 PD 患者黑质区蛋白存在自由基调节损伤机制,自由基调节损伤可激活前凋亡蛋白 Bax,同时还可破坏线粒体 DNA (mtDNA),进一步加重 PD 症状^[13-14]。而抑制 Caspase-3 蛋白的表达可以减轻黑质神经元凋亡^[15]。

丙泊酚作为静脉麻醉药物广泛使用于临床麻醉及重症监护患者的镇静治疗,研究表明丙泊酚可通过清除自由基、降低脂质过氧化作用、抑制凋亡蛋白的产生,而产生脑保护作用^[4,16]。丙泊酚的脑保护作用还表现为减少缺血再灌注后脑梗死面积^[17]。此外研究显示丙泊酚对 MPTP 诱导的 PD 小鼠多巴胺能神经元产生保护作用,其机理是通过抑制环氧化酶 (COX) 蛋白表达来实现^[17]。因此,在本研究中我们假设氧化应激在 PD 病程发展中具有重要作用^[7],丙泊酚具有抗氧化、抑制凋亡蛋白表达等脑保护作用,对 MPTP 诱导的 PD 小鼠黑质神经元亦具保护作用。

本研究中,在 MPTP 诱导的小鼠帕金森模型中,免疫组化显示黑质区多巴胺能神经元凋亡细胞增加,经丙泊酚干预后多巴胺能神经元凋亡细胞减少,说明丙泊酚具有抗凋亡作用。丙泊酚处理后的 MPTP 小鼠,免疫组化及 Western blot 显示 Bcl-2 表达增加,而 Bcl-2 具有抗凋亡作用,可抑制脂质过氧化^[16],表明丙泊酚抑制 PD 小鼠黑质区神经元凋亡可能通过抑制氧化应激实现的。Wang 等^[17]认为丙泊酚脑保护并不存在剂量依赖性,而 Gelb 等^[18]认为镇静剂量的丙泊酚不产生脑保护作用。本研究中丙泊酚剂量 100 mg/kg,PD 小鼠接受腹腔注射后 2 min 后肢体反射消失,但呼吸存在,30 min 后可恢复

(下转第 371 页)

type 2 myocardial infarction using a high-sensitivity cardiac troponin I assay with sex-specific 99th percentiles based on the third universal definition of myocardial infarction classification system [J]. Clin Chem, 2015, 61(4): 657-663.

[11] Jneid H, Alam M, Virani SS, et al. Redefining myocardial infarction: what is new in the ESC/ACCF/AHA/WHF third universal definition of myocardial infarction? [J] Methodist Debaque Cardio-

vasc J, 2013, 9(3): 169-172.

[12] de Waal BA, Buise MP, van Zundert AA. Perioperative statin therapy in patients at high risk for cardiovascular morbidity undergoing surgery: a review [J]. Br J Anaesth, 2015, 114(1): 44-52.

(收稿日期: 2015-05-07; 修回日期: 2015-06-13)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)

(上接第 348 页)

处理前状态, 这与 Kozue 等^[19]认为 100 mg/kg 丙泊酚腹腔注射可提供 MPTP 诱导 PD 小鼠中等麻醉深度结果一致。

本研究还观察了模型建立后 2 h 和 24 h 给予丙泊酚对黑质神经元凋亡的影响, 发现 24 h 后给予丙泊酚显示出更好的抗凋亡作用, 这可能与 MPTP 诱导的黑质神经元凋亡的时程相关, 即模型建立后 24 h 时神经元的凋亡较 2 h 时更显著, 此时给予丙泊酚显示更明显的抗凋亡效果, 其机制需要进一步研究。此外, 相关研究认为通过连续 5 次腹腔注射 MPTP 可以构建稳定的小鼠亚急性 PD 模型^[20], 故本研究中小鼠 PD 模型制备后未施行为学检测。

综上所述, 丙泊酚可减轻 MPTP 诱导的小鼠黑质神经元的凋亡, 该效应可能与其抑制 Caspase-3 活性、促进 Bcl-2 作用有关。

【参考文献】

[1] 郭玉霞, 杨波, 石磊, 等. 姜黄素对中脑定位注射脂多糖引起帕金森样病变小鼠抗炎机制研究 [J]. 医学研究生学报, 2012, 25(6): 582-587.

[2] 胡晓, 王省, 闫福岭, 等. 帕金森病患者便秘发生情况的临床观察 [J]. 东南国防医药, 2013, 15(4): 332-334.

[3] Korah PK, Nandhu MS, Jes P. Oxidative stress mediated neuronal damage in the corpus striatum of 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rats; neuroprotection by serotonin, GABA and bone marrow cells supplementation [J]. J Neurosci, 2013, 331(2): 31-37.

[4] Yoshinori K, Yoshimi N, Tatsuya H, et al. Propofol exerts greater neuroprotection with disodium edentate than without it [J]. J Cerebral Blood Flow Metabolism, 2008, 28(1): 354-366.

[5] Cui DR, Wang L, Jiang W, et al. Propofol prevents cerebral ischemia-triggered autophagy activation and cell death in the rat hippocampus through the NF- κ B/p53 signaling pathway [J]. Neurosci, 2013, 246(2): 117-132.

[6] 沈琮, 张兰, 李林. 以 α -synuclein 为靶点的抗帕金森病药物研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 830(2): 149-153.

[7] Michael T, Lin M, Flint B. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. Nature, 2006, 443(19): 787-795.

[8] Mermill JE, Koyanagi Y, Zack J. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease

[J]. Neurosci, 2010, 30(1): 1166-1175.

[9] Zhai A, Zhu X, Wang X, et al. Secalonic acid A protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced cell death via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Eur J Pharm, 2013, 713(1-3): 58-67.

[10] Song JX, Shaw PC, Wong NS, et al. Chrysotoxine, a novel bibenzyl compound selectively antagonizes MPP⁺, but not rotenone, neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells [J]. Neurosci Lett, 2012, 521(1): 76-81.

[11] 刘红军, 朱红梅, 程祝强, 等. 吗啡和曲马多对 MADB-106 乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 东南国防医药, 2014, 16(5): 449-452.

[12] Thierry R, Reynald O, Laurent M, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome C [J]. Nature, 1998, 391(29): 496-499.

[13] Anthony HS. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Lancet Neurol, 2008, 7(1): 97-108.

[14] Perier C, Tieu K, Guegan C, et al. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage [J]. Proc Nall Acad Sci USA, 2005, 102(1): 19126-19131.

[15] Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, et al. Caspase signaling controls microglia activation and neurotoxicity [J]. Nature, 2011, 472(7343): 319-324.

[16] Xi HJ, Zhang TH, 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(1): 24-32.

[17] Wang HY, Wang GL, Yu YH, et al. The role of phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway in propofol-induced postconditioning against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Brain Res, 2009, 1297(4): 177-184.

[18] Gelb AW, Bayona NA, Wilson JX, et al. Propofol anesthesia compared to awake reduces infarct size in rats [J]. Anesthesiology, 2002, 96(2): 1183-1190.

[19] Kozue K, Takefumi I, Koh S. Possible role of propofol's cyclooxygenase-inhibiting property in alleviating dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra in an MPTP-induced murine model of Parkinson's disease [J]. Brain Res, 2011, 1387(1): 125-133.

[20] Petroske E, Meredith GE, Callen S, et al. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment [J]. Neuroscience, 2001, 106(1): 589-601.

(收稿日期: 2015-03-09; 修回日期: 2015-03-19)

(本文编辑: 齐名; 英文编辑: 王建东)