

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002662

异丙酚缓解大鼠脑缺血再灌注损伤及其机制研究

钟微微¹, 夏洪莲², 丁冰¹, 徐建军³

(1. 牡丹江医学院第一临床医学院, 牡丹江 157011;

2. 牡丹江医学院附属红旗医院麻醉科医药研究中心, 牡丹江 157011; 3. 大庆油田总医院麻醉科, 大庆 163000)

【摘要】目的:探究麻醉药物异丙酚缓解大鼠脑缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion, IR)的作用及机制。**方法:**健康雄性 SD 大鼠 72 只, 随机分为假手术组、模型组、异丙酚(Pro)组、Pro+DPCPX 组、Pro+LY294002 组、Pro+DPCPX+LY294002 组, 每组 12 只。血管内线栓法阻断大脑中动脉, 建立局灶性 IR 损伤模型, 再灌注 24 h 后进行大鼠神经功能评分, ELISA 检测血浆肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 含量, TTC 染色检测脑梗死体积, 免疫组织化学法检测 Bcl-2 阳性细胞表达情况, Western blot 检测 Akt、p-Akt 表达量。**结果:**与模型组大鼠相比, 异丙酚能够有效降低 IR 大鼠神经功能评分, 缩小脑梗死体积, 提高脑组织 Bcl-2 阳性细胞表达率, 有效降低 IR 大鼠血浆炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平 ($P<0.05$)。与此同时, 异丙酚能够明显升高大脑皮质区 p-Akt 表达 ($P<0.05$), 异丙酚干预的 IR 大鼠体内 PI3K/Akt 信号通路呈高度激活状态。当实验大鼠加 PI3K 抑制剂 LY294002 处理时, 异丙酚的神经保护作用被明显抑制, 失去治疗效果。其抑制作用与 A1R 受体拮抗剂 DPCPX 效果相当。**结论:**异丙酚能够在 IR 大鼠模型中激活 A1R, 通过抑制兴奋性氨基酸的毒性, 促进 p-Akt 表达, 进一步激活 PI3K/Akt 信号通路, 上调脑组织 Bcl-2 表达水平, 发挥抗神经细胞凋亡作用, 同时下调炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达, 减轻机体的炎症反应, 发挥良好的脑缺血再灌注损伤缓解作用。

【关键词】异丙酚; 脑缺血再灌注损伤; 分子机制; PI3K/Akt 信号通路**【中图分类号】**R743.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-03-12

Remission of propofol on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism

Zhong Weiwei¹, Xia Honglian², Ding Bing¹, Xu Jianjun³

(1. First Clinical Medical College, Mudanjiang Medical University;

2. Medical Research Center of Anesthesiology, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical University;

3. Department of Anesthesiology, Daqing Oilfield General Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect and mechanism of anesthesia drug propofol on cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury in rats. **Methods:** Seventy-two healthy male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, propofol (Pro) group, Pro + DPCPX group, Pro + LY294002 group, Pro + DPCPX + LY294002 group, with 12 rats in each group. The middle cerebral artery was blocked by the intravascular endothelial method, and a focal cerebral IR injury model was established. Rats were scored for neurological function 24 hours after reperfusion. Plasma levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The brain was detected by Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining infarct volume, the expression of Bcl-2 positive cells was detected by immunohistochemistry, and the expression of Akt and p-Akt was detected by Western blot. **Results:** Compared with the model group, propofol effectively reduced the neurological score of IR rats and the volume of cerebral infarction, increased the expression rate of Bcl-2 positive cells in brain tissue, and

作者介绍: 钟微微, Email: zhongww2017@163.com,

研究方向: 麻醉相关基础医学研究及临床工作。

通信作者: 徐建军, Email: 1275304402@qq.com。

基金项目: 黑龙江省省属高校基本科研业务费资助项目 (编号: 2017-KYYWF-0642); 牡丹江医学院研究生创新科研一般资助项目 (编号: 2018YJSCX-11MY)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201014.1240.008.html> (2020-10-14)effectively reduced the expression levels of plasma inflammatory factor TNF- α and IL-1 β in IR rats ($P<0.05$). At the same time, propofol significantly increased the level of p-Akt expression in the cerebral cortex ($P<0.05$), and the PI3K/Akt signaling pathway in IR rats interfered with by propofol was highly activated. When the experimental rats were treated with the PI3K inhibitor LY294002, the neuroprotective effect of propofol was significantly inhibited and the therapy was ineffective. Its in-

hibitory effect was comparable to that of A1R receptor antagonist DPCPX. **Conclusion:** Propofol can activate A1R in IR rat models by inhibiting the excitatory amino acid toxicity, promote the expression of p-Akt, further activate the PI3K/Akt signaling pathway, up-regulate the expression level of Bcl-2 in brain tissue, and exert anti-apoptotic effects. At the same time, it can down-regulate the expression of inflammatory factors TNF- α and IL-1 β , reduce the body's inflammatory response, and thus exerts a good therapeutic effect.

[Key words] propofol; cerebral ischemia-reperfusion injury; molecular mechanism; PI3K/Akt signaling pathway

由动脉血栓栓塞引起的脑缺血具有高发生率和复发率,是危害中老年人的严重疾病。大脑对氧的需求量大,比其他器官更容易受到缺血损伤,及时溶栓治疗缺血性脑损伤后,血液的再次灌流会进一步导致组织氧化应激,引发大范围细胞坏死,即出现缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion, IR)^[1-2]。减轻 IR 对治疗脑缺血具有重要意义。IR 病理机制复杂,包括细胞内钙超载、兴奋性神经递质释放、炎症反应、氧化应激及细胞凋亡等^[3-5]。异丙酚是临床常用静脉麻醉药,具有镇静、抗炎及抗氧化应激作用。磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)是细胞内重要的促增殖及抗凋亡信号。据报道,异丙酚激活腺苷 A1 受体(A1R),抑制兴奋性氨基酸毒性,可以实现神经细胞抗凋亡作用^[6-7]。同时有研究表明,激活 PI3K/Akt 信号能够在 IR 中发挥脑保护作用^[8-9]。异丙酚能否通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥神经保护作用,从而治疗 IR? 本文将对此展开研究,具体分析异丙酚减轻大鼠脑 IR 损伤的效应及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性大鼠 72 只,体质量 220~240 g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,动物许可证号:SCXK(辽)2015-0001。

1.1.2 试剂与仪器 异丙酚、腺苷 A1 受体拮抗剂 DPCPX、二甲基亚砜溶剂购于美国 Sigma 公司;PI3K 抑制剂 LY294002 购于 MedChemExpress 公司;Bcl-2 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色剂购于博奥森生物;Akt/p-Akt 抗体购于 CST, TTC 染料购自索莱宝生物科技有限公司;激光多普勒组织血流仪、立体定位仪购于瑞沃德生命科技公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 健康雄性 SD 大鼠 72 只,随机分为假手术组、模型组、异丙酚(Pro)组、Pro+DPCPX 组、Pro+LY294002

组、Pro+DPCPX+LY294002 组,每组 12 只。Pro 组在造模前,预先按照大鼠体质量计算好所需 10 mg/mL 用量的异丙酚溶液,对大鼠进行股静脉穿刺置管,然后按照 0.1 mL/(kg·min)或 1 mg/(kg·min)的速率持续泵注 30 min;Pro+DPCPX 组在异丙酚预处理前腹腔注射 1 mg/kg 的 DPCPX;Pro+LY294002 组于异丙酚预处理前 30 min,应用立体定位仪,在脑室内注射 10 μ L LY294002 (10 mmol/L);Pro+DPCPX+LY294002 组在异丙酚预处理前腹腔注射 1 mg/kg 的 DPCPX,脑室内注射 10 μ L LY294002;假手术组不造模,模型组不予药物处理。

1.2.2 大鼠 IR 模型的制备 血管内线栓法制备局灶性脑缺血(MCAO)再灌注模型^[10]:颈部备皮,分离颈部肌肉,游离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(CA)。结扎离断颈外动脉,在残端剪一小口,根据大鼠体质量选用球端直径为(0.32 $\pm$ 0.02) mm 栓线置入。眼科镊轻推线栓尾端,经 CCA 沿 CA 进入颅腔,直至进入大脑中动脉,阻断大脑中动脉供血区血流,固定好线栓,缝合切口,线栓尾端留于皮肤外。缺血 2 h,再次麻醉后,回抽线栓至 ECA 残端再灌注 24 h。左侧股静穿刺以小儿 24 号静脉留置针插管,以备输注药物。手术过程使用加热垫,保持大鼠肛温 37 $^{\circ}$ C。采用激光多普勒组织血流仪监测期间大鼠的脑血流变化。

1.2.3 行为学评分标准 大鼠脑缺血再灌注 24 h 后,采用单盲法,按五级四分法进行神经功能评分:无神经功能障碍记为 0 分;不能完全伸展对侧前肢,轻度神经功能障碍记为 1 分;中度神经功能障碍,向对侧旋转记为 2 分;重度神经功能障碍,向对侧倾倒记为 3 分;极重度神经功能障碍,无自主活动伴意识水平下降记为 4 分。

1.2.4 ELISA 法检测血浆肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 大鼠经股静脉取血,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 取上清液,将标准蛋白样品与待测样品加入含有一抗的 96 孔板,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,描绘标准曲线,计算待测样品中 TNF- α 和 IL-1 β 含量。

1.2.5 脑梗死 TTC 染色 10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,取完整脑组织于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷 20 min,从脑前极与视交叉连线中点处开始,以 2 mm 间距连续冠状切片 6 片,置于 2% TTC 溶液中 37 $^{\circ}$ C 温箱避光孵育 30 min。采用 Image Pro-Plus 6.0 计算梗死体积(粉红色区域为正常脑组织,白色区域为梗死组织),统计梗死体积与正常体积百分比。

1.2.6 免疫组化染色 石蜡标本依次将切片行抗原修复,灭活内源性过氧化酶,封闭,滴加抗鼠 Bcl-2 抗体(一抗)4℃过夜,第2天加二抗(生物素标记的羊抗兔 IgG)孵育,滴加辣根酶标记的链霉亲和素工作液孵育,滴加 DAB 显色液,显微镜下观察到满意的阳性结果时终止染色。复染、分化、水洗、脱水、透明、中性树脂封片,阴性对照采用 PBS 液代替一抗。用 Image Pro-Plus 6.0 采集图片,每张切片随机取 5 个高倍镜视野(400×),计数 Bcl-2 阳性细胞。

1.2.7 Western blot 法检测大鼠皮质区 p-Akt、Akt 的表达 取脑组织,加入细胞裂解液,通过微量核酸蛋白仪测定蛋白含量。经过 SDS-PAGE 电泳、转膜(PVDF)、封闭,加入一抗 4℃过夜,加入二抗,显色,曝光成像。用凝胶图像处理系统分析目的条带,GAPDH 作为内参,计算 Akt、p-Akt 的 p-Akt 相对蛋白含量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较均采用单因素方差分析,方差齐则采用 LSD 方法检验,方差不齐则采用 Tamhane 检验进行两两比较;神经功能评分采用非参数秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 异丙酚对 IR 大鼠神经功能评分及脑梗死面积百分比的影响

假手术组大鼠未出现神经功能损伤,也未出现脑梗死。模型组大鼠的神经功能评分及脑梗死面积百分比均明显升高($P=0.003$),造模成功。与模型组大鼠相比,异丙酚治疗组大鼠的神经功能评分明显降低,脑梗死体积也明显下降($P=0.008$),说明 Pro 对脑缺血再灌注损伤具有良好的保护作用。

但这种保护作用会被 A1R 拮抗剂 DPCPX 和 PI3K 抑制剂 LY294002 阻断,这 2 种阻断剂单独作用及联合应用都能有效抑制 Pro,但组间并未显示出明显差异(表 1、图 1)。

表 1 各组大鼠脑缺血再灌注 24 h 后神经功能评分及

脑梗死面积比较		
分组	脑梗死面积百分比/%	神经功能评分
假手术组	0.00 ± 0.00	0.0 ± 0.0
模型组	45.39 ± 4.50 ^a	3.2 ± 0.7 ^a
Pro组	21.93 ± 1.11 ^{ab}	1.1 ± 0.5 ^{ab}
Pro+DPCPX组	42.21 ± 4.13 ^{ac}	3.0 ± 0.6 ^{ac}
Pro+LY294002组	41.63 ± 3.25 ^{ac}	3.1 ± 0.7 ^{ac}
Pro+DPCPX+LY294002组	45.67 ± 2.68 ^{ac}	3.5 ± 0.8 ^{ac}

注:a,与假手术组比较, $P < 0.01$;b,与模型组比较, $P < 0.01$;c,与 Pro 组比较, $P < 0.01$

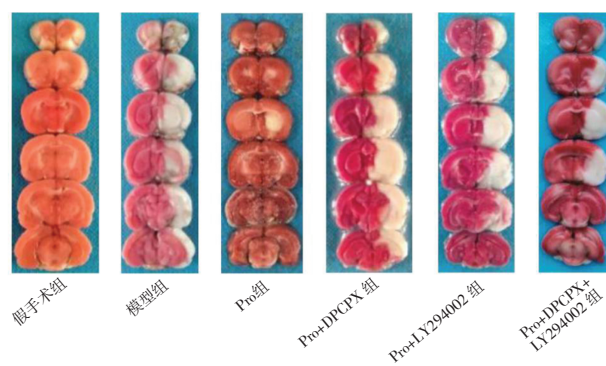
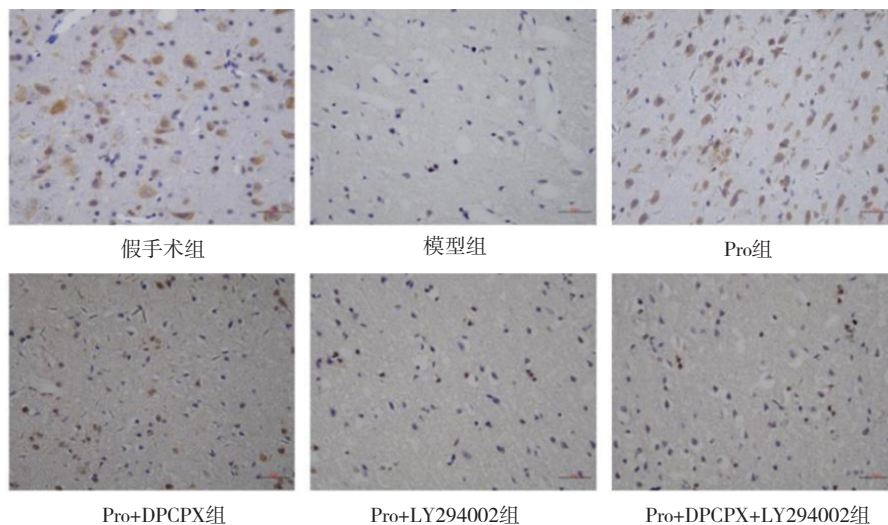


图 1 各组大鼠脑梗死 TTC 染色情况

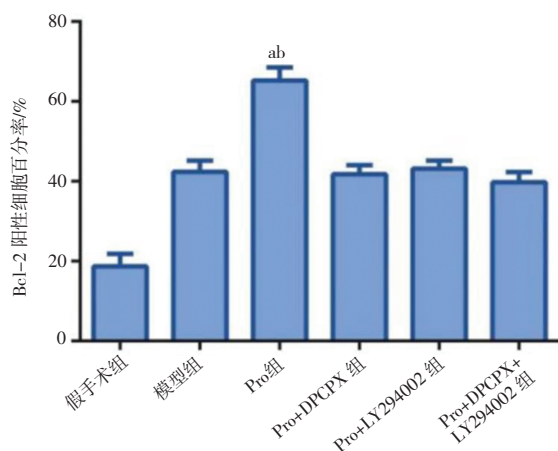
2.2 各组大鼠脑组织细胞凋亡情况

Bcl-2 免疫组化染色结果显示,与模型组相比,Pro 组的 Bcl-2 阳性细胞表达明显增加($P=0.007$),Pro 显现出良好的抗神经细胞凋亡作用;但当加入 DPCPX、LY294002 或者这两者联合应用时,Pro 的神经保护作用被明显抑制,Bcl-2 阳性细胞表达率明显降低($P < 0.01$)(图 2、图 3)。



注:Bcl-2 阳性表达表现为胞质呈棕褐色

图 2 各组大鼠脑皮质 IHC 染色 (400×)

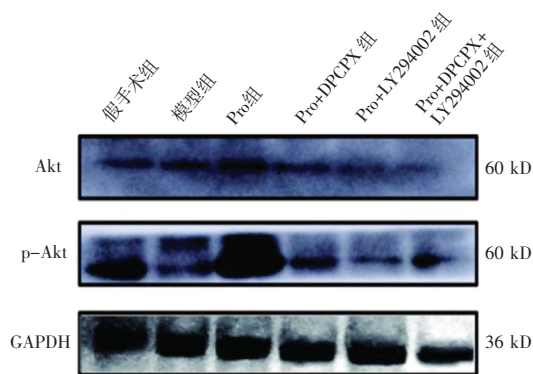


注:a,与模型组比较, $P<0.01$;b:与Pro+DPCPX组、Pro+LY294002组、Pro+DPCPX+LY294002组比较, $P<0.01$

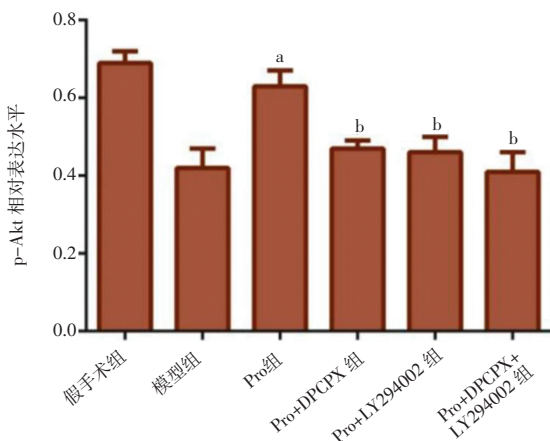
图3 免疫组化分析 Bcl-2 的阳性细胞

2.3 各组大鼠大脑皮质区 p-Akt、Akt 表达情况

Western blot 结果显示,与模型组相比,Pro 组大鼠大脑皮质区的 p-Akt/Akt 表达水平明显升高($P=0.023$);与 Pro 组相比,加入阻断剂之后,Pro+DPCPX 组、Pro+LY294002 组及 Pro+DPCPX+LY294002 组的 p-Akt/Akt 的表达水平明显降低($P=0.012$),组间无明显差异(图4)。



A. Western blot 检测大鼠皮质区 p-Akt、Akt 蛋白表达水平



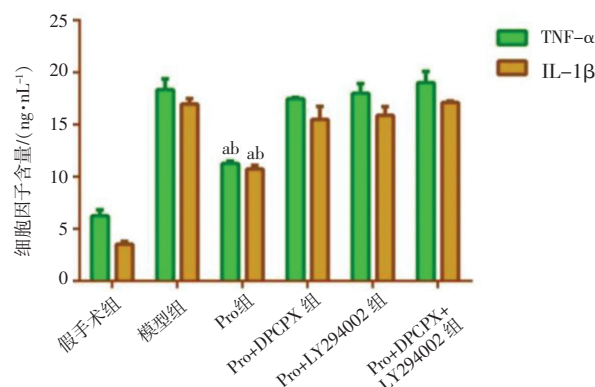
注:a,与模型组比较, $P<0.05$;b:与Pro组比较, $P<0.05$

B. 各组大鼠大脑皮质区 p-Akt 相对表达水平定量

图4 异丙酚对脑缺血再灌注损伤后 p-Akt/Akt 表达水平的影响

2.4 各组大鼠血浆 TNF- α 和 IL-1 β 的变化

与模型组大鼠相比,Pro 组大鼠血浆的 TNF- α 和 IL-1 β 表达量明显降低($P=0.007$),加入阻断剂之后,Pro+DPCPX 组、Pro+LY294002 组及 Pro+DPCPX+LY294002 组 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平均有所升高,Pro 的作用均被明显抑制($P<0.01$),但组间无明显差异(图5)。



注:a,与模型组比较, $P<0.01$;b:与Pro+DPCPX组、Pro+LY294002组、Pro+DPCPX+LY294002组比较, $P<0.01$

图5 各组大鼠血浆 TNF- α 和 IL-1 β 表达量

3 讨论

缺血性脑血管病是引起人类死亡的重要疾病,当血液再次灌流缺血性脑损伤组织后,进一步导致组织氧化应激损伤,引发大范围的细胞坏死。IR 病理机制十分复杂,涉及炎症反应、氧化应激及细胞凋亡等。PI3K/Akt 信号通路可以促进 Bcl-2 表达,抑制 Bax 从而发挥作用,是细胞内重要的抗氧化应激、抗凋亡信号通路。据报道,PI3K/Akt 信号的激活,能够在脑缺血再灌注损伤过程中发挥脑保护的作用^[11]。静脉麻醉药物异丙酚具有镇静、抗炎及抗氧化应激的作用。本课题组在前期研究中发现,异丙酚能够通过激活 A1R,抑制兴奋性氨基酸的毒性,抵抗神经细胞凋亡。同时有研究表明,异丙酚预处理能够在肠和肺组织中影响 PI3K/Akt 信号,能够上调 Akt 的表达,上调 Bcl-2,降低细胞 Caspase-3 表达水平,从而发挥抗凋亡效果^[12]。

此外,异丙酚能够部分通过降低促炎症细胞因子释放,从而保护肝脏免受 IR 损伤^[13]。本实验采用 MCAO 大鼠模型,应用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002,抑制 PI3K/Akt 信号通路的传导,同时检测大鼠脑皮质缺血区 Bcl-2 蛋白表达水平及信号通路关键蛋白

p-Akt、Akt 的表达变化,探究异丙酚是否能够通过激活 PI3K/Akt 信号通路的作用机制,从而发挥脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用。研究结果显示,与模型组大鼠相比,异丙酚能够有效降低 IR 大鼠的神经功能评分,缩小脑梗死体积,对 IR 具有预期的良好缓解作用。异丙酚可以明显提高脑组织中 Bcl-2 阳性细胞的表达率,经过异丙酚干预,大鼠神经细胞的凋亡得到明显缓解,异丙酚具有十分有效的抗凋亡神经保护作用。进一步探究其作用机制,结果显示异丙酚治疗下,IR 大鼠血浆炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平明显降低,炎症反应是脑缺血再灌注损伤的重要诱因,异常的免疫调节状态使巨噬细胞向 M1 亚型过度极化,大量分泌 TNF- α 和 IL-1 β 等促炎因子。广泛的炎症反应诱导大脑组织进一步损伤。异丙酚通过降低促炎因子的表达水平,能够缓解大鼠体内的炎症反应进而缓解 IR。与此同时,异丙酚能够明显升高大脑皮质区 p-Akt 表达水平,异丙酚干预的 IR 大鼠体内 PI3K/Akt 信号通路呈高度激活状态,高度激活的 PI3K/Akt 信号通路可以进一步促进 Bcl-2 表达,抑制凋亡蛋白 Bax 的作用,在抵抗神经细胞凋亡的同时发挥抗组织氧化应激的作用。当实验大鼠加以 PI3K 抑制剂 LY294002 处理时,异丙酚的神经保护作用被明显抑制,失去了治疗效果。其抑制作用与 A1R 受体拮抗剂 DPCPX 效果相当。说明异丙酚与其受体结合后,通过进一步调节 PI3K/Akt 信号进而发挥神经保护作用。

综上所述,异丙酚能够在 IR 大鼠模型中发挥良好的脑缺血再灌注损伤缓解作用,其通过激活 A1R,抑制兴奋性氨基酸的毒性,促进 p-Akt 表达,进一步激活 PI3K/Akt 信号通路,进而上调脑组织 Bcl-2 表达水平,发挥抗神经细胞凋亡作用。同时,异丙酚下调血浆中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,减轻机体的炎症反应,从而发挥良好的治疗效果。PI3K 抑制剂 LY294002 及腺苷 A1 受体拮抗剂 DPCPX 能够有效抑制异丙酚的治疗作用。本研究再次验证了异丙酚对 IR 大鼠的脑保护作用,同时进一步阐述了其分子作用机制。但由于实验样本数目比较少,具体的分子机制仍需进一步加以验证。

参 考 文 献

- [1] 雷 敏,吴丽荣,刘 英. 氯沙坦对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制[J]. 中国动脉硬化杂志,2020,28(3):213-218.
- [2] 陈人豪,王 琦,李 俊,等. 刺五加提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理,2020,31(1):37-42.
- [3] Xia D,Zhang Z,Zhao Y. Acteoside attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Biol Pharm Bull,2018,41(11):1645-1652.
- [4] Akhtar F,Rouse CA,Catano G,et al. Acute maternal oxidant exposure causes susceptibility of the fetal brain to inflammation and oxidative stress[J]. J Neuroinflammation,2017,14(1):195.
- [5] Manzanero S,Santro T,Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke:sources and contribution to cell injury[J]. Neurochem Int,2013,62(5):712-718.
- [6] 夏洪莲,韩琨元,王均炉,等. 腺苷 A1 受体介导异丙酚预处理对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的缺血耐受[J]. 中国临床药理学与治疗学,2016,21(4):389-394.
- [7] 夏洪莲,陈 猛,芦相玉,等. 腺苷 A1 受体拮抗剂对异丙酚诱导脑缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015,20(7):727-731.
- [8] Luo S,Li H,Mo Z,et al. Connectivity map identifies luteolin as a treatment option of ischemic stroke by inhibiting MMP9 and activation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Exp Mol Med,2019,51(3):1-11.
- [9] Li X,Li F,Ling L,et al. Intranasal administration of nerve growth factor promotes angiogenesis via activation of PI3K/Akt signaling following cerebral infarction in rats[J]. Am J Transl Res,2018,10(11):3481-3492.
- [10] Longa EZ,Weinstein PR,Carlson S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [11] Wang C,Su K,Zhang Y,et al. IR-A/IGF-1R-mediated signals promote epithelial-mesenchymal transition of endometrial carcinoma cells by activating PI3K/AKT and ERK pathways[J]. Cancer Biol Ther,2019,20(3):295-306.
- [12] Li Q,Cui S,Jing G,et al. The role of PI3K/Akt signal pathway in the protective effects of propofol on intestinal and lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion[J]. Acta Cir Bras,2019,34(1):e20190010000005.
- [13] Wei L,Chen WY,Hu T,et al. Effect and mechanism of propofol in hepatic ischemia/reperfusion injury of rat[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2017,21(15):3516-3522.

(责任编辑:唐秋姗)