

• 基础研究 •

异丙酚对全脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用及其机制研究

王涛 刘晓媛 赵继宗 张淑珍

[摘要] 目的 探讨静脉麻醉药异丙酚对全脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用及其机制。方法 成年雄性 Wistar 大鼠 19 只,随机分为缺血组($n=7$)、异丙酚组($n=7$)和假手术对照组($n=5$)。采用 Pulsinelli 法制备大鼠全脑缺血再灌注模型。异丙酚组再灌注开始后立即静脉输注异丙酚 1.5 ml/h,持续 30 min。于再灌注 24 h 取脑,流式细胞仪检测凋亡率、坏死率、bcl-2、Bax 和 p53 蛋白在大鼠海马神经元中的表达情况。结果 异丙酚可以降低大鼠全脑缺血再灌注 24 h 海马神经元的凋亡率和坏死率($P<0.05$),与缺血组比较,异丙酚组 Bax、p53 的蛋白表达均降低($P<0.05$),而 bcl-2 的变化无显著性差异($P>0.05$)。结论 异丙酚能降低大鼠全脑缺血再灌注神经元的凋亡率和坏死率,其机制可能与降低促凋亡基因 Bax 和 p53 蛋白的表达有关。

[关键词] 异丙酚;脑缺血;缺血再灌注损伤;凋亡;基因

Cerebral protection effect and mechanism of propofol on global cerebral ischemia and reperfusion damage in rats WANG Tao, LIU Xiao-yuan, ZHAO Ji-zong, et al. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

[Abstract] Objective To determine the cerebral protection effect and mechanism of propofol on global cerebral ischemia and reperfusion damage in rats. Methods 19 adult male Wistar rats were randomly divided into 3 groups, ischemia group ($n=7$), propofol group ($n=7$), and sham injury group ($n=5$). Global cerebral ischemia and reperfusion model were made by means of Pulsinelli's method. Rats in propofol group were anesthesia with propofol at the dosage of 1.5 ml/h for 30 min at the beginning of reperfusion. Apoptosis and necrosis rate were detected by cytometry. In the same time, bcl-2, Bax and p53 protein expression in hippocampus neurons were detected. Results The apoptosis and necrosis rate in propofol group were significantly decreased as compared with ischemia group ($P<0.05$). Bax and p53 protein expression in hippocampus neurons were also significantly decreased as compared with ischemia group ($P<0.05$), however, no significant findings in bcl-2 protein expression ($P>0.05$). Conclusion Propofol can decrease apoptosis and necrosis rate in cerebral ischemia reperfusion injured neuron, and the mechanism maybe related to decreasing the expression of Bax, p53 protein.

[Key words] propofol; cerebral ischemia; reperfusion damage; apoptosis; gene

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2004)08-0464-02

[本文著录格式] 王涛,刘晓媛,赵继宗,等.异丙酚对全脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用及其机制研究[J].中国康复理论与实践,2004,10(8):464-465.

异丙酚能降低脑血流量、脑耗氧量和颅内压,是神经外科麻醉中广泛应用的静脉麻醉药。然而,异丙酚的脑保护作用及其可能的机制尚不明确。本研究通过流式细胞仪检测大鼠全脑缺血再灌注后神经元的凋亡率、坏死率和凋亡相关基因蛋白的表达情况,探讨异丙酚对大鼠全脑缺血再灌注神经元的保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组 雄性健康 Wistar 大鼠 19 只,体重 250—300 g,随机分为 3 组:缺血组($n=7$)、异丙酚组($n=7$)和假手术对照组($n=5$)。缺血组和异丙酚组采用 Pulsinelli 法^[1]制备大鼠全脑缺血再灌注损伤模型。制备过程为:腹腔内注射 10%水合氯醛 0.03 ml/kg,分离双侧翼孔并电凝烧闭椎动脉;2 d 后,腹腔内注射 10%水合氯醛 0.03 ml/kg,分离双侧颈总动

脉,在双侧颈总动脉环绕丝线,经丝线提出颈总动脉,用临时阻断夹夹闭颈总动脉造成全脑缺血,10 min 后松开阻断夹,缝合皮肤;温度探头插入颞肌,观察头部温度,白炽灯照射大鼠头部,维持温度在 37℃左右;颅骨钻孔,采用瑞典 Perimed 公司 Periflux 5010 型激光多普勒血流仪(Laser Doppler Flowmetry, LDF),PE-420 型纤维探头安置于右侧顶叶皮层,深度 1 mm 监测局部脑血流。夹闭颈总动脉后脑血流降低小于 50%者剔除。假手术对照组分离翼孔和颈总动脉,但不夹闭颈总动脉。异丙酚组于缺血后立即静脉持续输注异丙酚 1.5 ml/h,持续 30 min。

1.2 标本取材及处理 缺血组和异丙酚组大鼠于缺血再灌注 24 h,假手术组大鼠于手术后 24 h 麻醉、断头取脑。取出新鲜海马组织,加入 PBS 液,研磨,过 200 目筛,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加 PBST 700 μ l,记细胞数约为 1.2×10^7 个/ml。

1.3 Annexin V 染色 取 100 μ l 单细胞悬液,加 Annexin V/FITC 5 μ l,室温避光 30 min;PBS 洗,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;加 PBS 液 5 μ l,浓度为 20 g/ml PI,室温避光 10 min, PBS 洗,1 000 r/min 离心 5

作者单位:1. 100050 北京市,首都医科大学附属北京天坛医院神经外科(王涛,赵继宗);2. 100050 北京市,首都医科大学附属北京天坛医院麻醉科(刘晓媛,张淑珍)。作者简介:王涛(1969-),男,山东莱州市人,在职研究生,主治医师,主要研究方向:神经外科围手术期脑保护研究。

min,取 0.5 ml 用流式细胞仪检测。

1.4 表面抗原及细胞内抗原染色 取 4 只试管,各加 100 μ l 单细胞悬液,加入 triton X-100,终浓度为 1%,分别加入 bcl-2、Bax、p53 鼠单抗 2 μ l(1:50,Santa Cruz 公司产品)及空白对照。室温避光 30 min 后,PBS 洗,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 FITC 标记的抗鼠 IgG(1:100),室温避光 10 min 后,PBS 洗,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加含 0.5%多聚甲醛的 PBS 液 250 μ l,用流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,记数 10 000 个细胞。

1.5 统计学处理 用 FASCan 软件进行数据分析,分别记录细胞凋亡率和坏死率。同时,记录 bcl-2、Bax、p53 蛋白的表达百分率。结果处理采用 SPSS 软件包,组间用单因素方差分析。

表 1 异丙酚对大鼠全脑缺血再灌注神经元的影响(%)

组别	凋亡率	坏死率	bcl-2	Bax	p53
假手术对照组	1.28 \pm 0.5	0.90 \pm 0.38	1.07 \pm 0.27	46.09 \pm 5.37	4.17 \pm 0.72
缺血组	10.89 \pm 0.80 ^b	16.67 \pm 1.04 ^b	9.69 \pm 0.94 ^b	57.05 \pm 1.91 ^a	13.84 \pm 0.97 ^b
异丙酚组	7.01 \pm 0.79 ^{b,c}	12.80 \pm 0.92 ^{b,c}	9.45 \pm 1.16 ^b	49.93 \pm 5.41 ^c	10.34 \pm 1.65 ^{b,c}

注:与假手术对照组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;c:与缺血组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

异丙酚脑保护作用的机制常常是多位点和多渠道的。一般认为,其作用机制包括:①抑制钙离子内流;②具有抗氧化作用;③抑制兴奋性氨基酸的产生和释放;④降低脑氧代谢率和脑葡萄糖代谢率;⑤降低颅内压。目前,有研究表明,异丙酚可能具有抗凋亡作用,从而保护脑缺血神经元耐受缺血性损伤。

流式细胞术在临床和实验研究中的应用非常广泛。近年来,运用荧光标记的抗细胞表面及细胞内抗原的抗体,结合破膜打孔,渗透和固定技术,应用流式细胞仪可检测细胞表面及细胞内抗原的表达^[2]。

bcl-2 家族与哺乳动物细胞凋亡调节有关^[3],其家族成员有 bcl-2、bcl-xl、Bax、Bak 等,bcl-2、bcl-xl 为抑制凋亡基因,Bax、Bak 为促进凋亡基因,bcl-2 和 Bax 的表达比例决定细胞是否发生凋亡^[4]。

p53 是一种核磷酸化蛋白,以无活性状态产生,在需要其参与细胞生长和凋亡时才被激活。但激活 p53 而引起凋亡的机制仍不清楚。目前认为,p53 在凋亡中的作用与多种基因相互联系^[5],把损伤的细胞阻滞在 G1 期^[6]。还有报道认为,p53 诱导了 Bax 的表达,从而释放细胞色素 C 而活化 casepase 9^[7,8]。

本研究结果显示,异丙酚组的凋亡率和坏死率低于缺血组,表明异丙酚对海马神经元的凋亡有一定的抑制作用。同时,促凋亡基因 Bax 和 p53 在异丙酚组的表达低于缺血组,但两组 bcl-2 的表达无显著性差异,因而提示,在异丙酚对大鼠海马神经元缺血再灌注

2 结果

缺血组和异丙酚组神经元的凋亡率和坏死率明显高于假手术对照组($P < 0.01$),但与缺血组比较,异丙酚组神经元的凋亡和坏死率降低($P < 0.05$)。bcl-2 在假手术组表达极低,缺血组和异丙酚组 bcl-2 蛋白表达较假手术对照组明显升高($P < 0.01$),但缺血组和异丙酚组比较无显著性差异($P > 0.05$)。Bax 蛋白在假手术对照组即有高表达,缺血组 Bax 蛋白表达高于假手术对照组($P < 0.05$),异丙酚组 Bax 蛋白表达低于缺血组($P < 0.05$)。p53 蛋白在假手术对照组表达极低,缺血组和异丙酚组 p53 蛋白表达较假手术对照组明显升高($P < 0.01$),与缺血组比较,异丙酚组 p53 蛋白表达降低($P < 0.05$)。见表 1。

的保护作用中,抗凋亡基因 bcl-2 的作用甚微,可能与该药抑制凋亡促进基因 Bax 和 p53 的表达有关。但细胞凋亡过程中有多种细胞和因子参与,是一个相互影响和制约的复杂网络。有关异丙酚对脑缺血神经元保护作用的机制仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemic in unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10: 267—272.

[2] 史桂英,石学耕,胡大伟,等.流式细胞内细胞因子方法的建立[J].上海第二医科大学学报,1999,19:522—525.

[3] Lawrence H, Boise M, Gonzalez G, et al. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death[J]. Cell, 1993, 74:597—608.

[4] 母敬郁,饶明俐,杨翰仪.细胞凋亡与迟发性神经元死亡的研究基础[J].中风与神经疾病杂志,1996,13:185—187.

[5] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. A model for p53-induced apoptosis[J]. Nature, 1997, 389:300—305.

[6] Elderity WS, Harper JW, Oconner PM, et al. Waf1/cip1 is induced in p53-mediated G(1) arrest and apoptosis[J]. Cancer Res, 1994, 54:1169—1174.

[7] Yin C, Knudson C, Korsmeyer S, et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo[J]. Nature, 1997, 357:82—85.

[8] Li P, Nijihawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell, 1997, 91:479—489.

(收稿日期:2004-05-17)