

· 论 著 ·

普鲁泊福对 TNF- α 诱导的小鼠脊髓神经元凋亡及 Bax 表达的影响

夏建华^{1,2}, 石学银^{1*}, 徐振东¹, 刘刚¹, 王亚华¹

(1. 第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003; 2. 解放军第 411 医院麻醉科, 上海 200081)

[摘要] **目的:** 研究普鲁泊福(propofol)对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导的小鼠脊髓神经元凋亡及 Bax 表达的影响。**方法:** 脊髓神经元取自小鼠胎鼠,置于含 B27 的神经细胞培养基中培养,在培养第 7 天随机分为 6 组:对照组,50 $\mu\text{mol/L}$ 普鲁泊福组, TNF- α 组, 25 $\mu\text{mol/L}$ 普鲁泊福+TNF- α 组, 50 $\mu\text{mol/L}$ 普鲁泊福+TNF- α 组, 100 $\mu\text{mol/L}$ 普鲁泊福+TNF- α 组。在相应组中加入不同浓度的普鲁泊福,孵育 30 min,再加入 TNF- α 至终末浓度为 2 000 U/ml,培养 24 h 后,采用碘化丙锭(PI)/Hoechst33342 双染法检测细胞凋亡,于荧光显微镜下观察凋亡细胞。采用免疫细胞化学的方法检测 Bax 的表达。**结果:** 与对照组相比, TNF- α 组细胞凋亡百分率明显升高[(21.8 \pm 1.1)% vs (2.8 \pm 0.8)%, $P < 0.01$], Bax 表达明显增加[(0.251 \pm 0.016) vs (0.141 \pm 0.015), $P < 0.01$]; 而经不同浓度普鲁泊福(25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)处理后再加入 TNF- α 的各组与 TNF- α 组相比, 细胞凋亡百分率下降[(16.2 \pm 1.2)%, (15.3 \pm 0.6)%, (12.2 \pm 0.8)% vs (21.8 \pm 1.1)%, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$], Bax 的表达降低[(0.198 \pm 0.011), (0.188 \pm 0.012), (0.167 \pm 0.014) vs (0.251 \pm 0.016), P 均 < 0.05], 且呈现一定的剂量效应关系。**结论:** 临床浓度的普鲁泊福可能通过调节 Bax 的表达进而抑制由 TNF- α 诱导的脊髓神经元凋亡。

[关键词] 普鲁泊福; 肿瘤坏死因子 α ; 脊髓; 神经元; 细胞凋亡; Bax

[中图分类号] R 745.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0169-04

In vitro effects of propofol on apoptosis and Bax expression induced by TNF- α in mouse spinal cord neurons

XIA Jian-hua^{1,2}, SHI Xue-yin^{1*}, XU Zhen-dong¹, LIU Gang¹, WANG Ya-hua¹

(1. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Anesthesiology, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the *in vitro* effects of propofol on apoptosis and Bax expression induced by TNF- α in mouse spinal cord neurons. **Methods:** Spinal cord neurons were isolated from fetal mice and cultured in neurobasal medium with B27 supplement. On the 7th day of culture, neurons were randomly divided into 6 groups: control group, propofol (50 $\mu\text{mol/L}$) group, TNF- α group, propofol (25 $\mu\text{mol/L}$) with TNF- α group, propofol (50 $\mu\text{mol/L}$) with TNF- α group and propofol (100 $\mu\text{mol/L}$) with TNF- α group. Propofol with different concentrations was incubated with cultured cells for 30 min, then TNF- α was added with the final concentration of 2 000 U/ml for another 24 h incubation. Apoptosis was detected by PI/Hoechst33342 double staining technique and fluorescence microscopy. Bax expression was determined by immunocytochemical technique. **Results:** The apoptosis rate and expression of Bax in TNF- α group were both increased compared with those in control group [(21.8 \pm 1.1)% vs (2.8 \pm 0.8)%, $P < 0.01$; [0.251 \pm 0.016] vs [0.141 \pm 0.015], $P < 0.01$]. The apoptosis rates and expression of Bax in 3 propofol groups (25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) were [(16.2 \pm 1.2)%, [15.3 \pm 0.6]%, and [12.2 \pm 0.8]%) and [(0.198 \pm 0.011), [0.188 \pm 0.012] and [0.167 \pm 0.014]), respectively, and they were all significantly decreased compared with those in TNF- α group [(21.8 \pm 1.1)% and [0.251 \pm 0.0163], all $P < 0.05$]. Moreover, a dose-dependent manner was observed in the above changes. **Conclusion:** Propofol within clinical concentration ranges may inhibit the apoptosis of spinal cord neurons induced by TNF- α through modulating the expression of Bax.

[KEY WORDS] propofol; tumour necrosis factor- α ; spinal cord; neuron; apoptosis; Bax

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 169-172]

细胞凋亡,亦称程序性细胞死亡,发生于各种病理与生理条件下,是一种由凋亡相关基因调控并以细胞早期 DNA 降解为特征的主动性死亡过程。近年来的研究表明,脊髓神经元在多种损伤因素的作用下均可发生凋亡。普鲁泊福作为一种临床常用的静脉麻醉药,对多种细胞的凋亡表现出抑制作用。本实验利用小鼠脊髓神经元体外培养模型,观察肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 对脊髓神经元的凋亡

效应以及普鲁泊福的保护作用,同时探讨其可能的

[基金项目] 上海市卫生局科委基金(024097). Supported by Fund of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(024097).

[作者简介] 夏建华,硕士,主治医师。

E-mail: jianhuaxia2000@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: shixueyin2000@yahoo.com.cn

机制。

1 材料和方法

1.1 试剂及动物来源 B27培养基为美国 Gibco 公司产品,胎牛血清(FCS)为杭州四季青公司产品,胰蛋白酶、多聚赖氨酸、TNF- α 、碘化丙锭(PI)及 Hoechst33342 均为美国 Sigma 公司产品。*Bax* 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。普鲁泊福由捷利康公司提供。孕 14 d 小鼠(BALB/c 系),购自中科院上海细胞生物与生化所实验动物中心。

1.2 脊髓神经元的体外培养 取出孕 14 d 小鼠胎鼠的脊髓后,先漂洗数次以去除血液和组织碎片,然后将脊髓置于盛有 4℃ 解剖液的培养皿中,于解剖镜下剪碎成 1 mm² 见方的小块,转移至含 0.25% 胰酶的离心管内,37℃ 消化 30 min,以全培养液(DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清、10% 马血清)终止消化,吸管分散细胞。1 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清液后,吹打混匀制成 5×10⁵/ml 密度的细胞悬液,接种于 6 孔培养板中,加入全培养液,置 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养,48 h 后加入阿糖胞苷(终浓度为 3 mol/L)以抑制胶质细胞增殖,继续培养 48 h 后换为无血清培养基(Neuralbasal+B27)以促进神经元的生长,以后隔天更换 50% 培养液 1 次。

1.3 实验分组 取培养 7 d 的脊髓神经元,随机分为:对照组(control);50 μ mol/L 普鲁泊福组(P₅₀);TNF- α 组(TNF- α);25 μ mol/L 普鲁泊福+TNF- α 组(P₂₅+TNF- α);50 μ mol/L 普鲁泊福+TNF- α 组(P₅₀+TNF- α);100 μ mol/L 普鲁泊福+TNF- α 组(P₁₀₀+TNF- α),每组 12 孔。按上述分组,在相应组中加入不同终浓度的普鲁泊福,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内孵育 30 min,再加入 TNF- α ,使终浓度为 2 000 U/ml,置于培养箱中,24 h 后取出。每组随机各取 6 孔用于检测细胞凋亡与 *Bax* 表达。

1.4 PI/Hoechst33342 双染法检测细胞凋亡 分别在每孔中加入荧光染料 Hoechst33342 至终浓度为 10 μ g/ml,37℃ 下染色 15 min。弃去染液,加入 PI 至终浓度 50 μ g/ml,4℃ 避光染色 15 min。紫外光激发,荧光显微镜下观察细胞形态及颜色,以区分出正常细胞、凋亡细胞及坏死细胞。荧光显微镜下染成红色荧光的细胞为坏死细胞,细胞核染色质凝聚、分布不均的高蓝色细胞为凋亡细胞,而染色质分布均匀的低蓝色细胞为正常存活细胞^[1]。每孔随机取 6 个视野,计数总细胞数和凋亡细胞数,计算出凋

亡百分率(apoptosis rate)。凋亡百分率=100%×凋亡细胞数/总细胞数。每组 6 孔,取平均值,并求出标准差。

1.5 免疫细胞化学法检测 *Bax* 的表达 *Bax* 检测参照试剂盒提供的说明进行。主要步骤如下:4% 多聚甲醛固定 1 h;新鲜配制 3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶 10 min;加入 1:10 正常山羊血清封闭液,室温 20 min,以减少非特异性背景染色;滴入 *Bax* 兔抗鼠一抗,4℃ 过夜;加入生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 反应 30 min;滴加 SABC,37℃ 反应 30 min;加入 DAB 显色,镜下控制显色时间。每孔随机取 6 个视野,metaMorph 计算机图像分析系统(Universal Imaging, USA)处理,自动计数 100 个阳性细胞,测出 *Bax* 在细胞中表达的平均光密度。

1.6 统计学处理 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据均采用 Nosa 软件进行统计学检验,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞凋亡检测结果 镜下可见对照组(图 1A)和 P₅₀ 组(图 1B)大多为低蓝色的正常细胞;偶见高蓝色的凋亡细胞和红色的坏死细胞。TNF- α 组(图 1C)以低蓝色的正常细胞为主,但高蓝色的凋亡细胞和红色的坏死细胞明显增多。P₂₅+TNF- α 组(图 1D)、P₅₀+TNF- α 组(图 1E)和 P₁₀₀+TNF- α 组(图 1F)均可见大量的正常细胞和散在其中较多的凋亡细胞,但凋亡细胞数量少于 TNF- α 组。如表 1 所示,与对照组相比 P₅₀ 组细胞凋亡百分率无显著差异,TNF- α 组细胞凋亡百分率显著升高($P < 0.01$);与 TNF- α 组相比,P₂₅+TNF- α 组、P₅₀+TNF- α 组和 P₁₀₀+TNF- α 组细胞凋亡百分率显著降低($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),且随普鲁泊福浓度的增加,细胞凋亡百分率逐渐降低,呈现出一定的剂量效应关系。

表 1 各组凋亡率和 *Bax* 表达的比较

Tab 1 Comparison of apoptosis rates and *Bax* expression in different groups

(n=6, $\bar{x} \pm s$)		
Group	Apoptosis rate(%)	<i>Bax</i>
Control	2.8±0.8	0.141±0.015
P ₅₀	3.6±0.4	0.138±0.018
TNF- α	21.8±1.1**	0.251±0.016**
P ₂₅ +TNF- α	16.2±1.2 Δ^*	0.198±0.011 Δ^*
P ₅₀ +TNF- α	15.3±0.6 Δ^*	0.188±0.012 Δ^*
P ₁₀₀ +TNF- α	12.2±0.8 $\Delta\Delta^*$	0.167±0.014 Δ^*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group or P₅₀ group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs TNF- α group

2.2 *Bax* 的免疫细胞化学染色 *Bax* 蛋白的免疫染色主要定位于胞质内,呈棕黄色。对照组(图 2A)和 P₅₀组(图 2B)细胞呈低表达,染色较淡。TNF- α 组(图 2C)棕黄色细胞明显增多,且染色较深。P₂₅+TNF- α 组(图 2D)、P₅₀+TNF- α 组(图 2E)和 P₁₀₀+TNF- α 组(图 2F)可见较多棕黄色细胞,但数

量较 TNF- α 组少,染色较深。如表 1 所示,与对照组相比 P₅₀组 *Bax* 蛋白表达差异无显著性, TNF- α 组 *Bax* 表达增加($P < 0.01$);与 TNF- α 组相比, P₂₅+TNF- α 组、P₅₀+TNF- α 组和 P₁₀₀+TNF- α 组 *Bax* 表达降低(P 均 < 0.05),并呈现出一定的剂量效应关系。

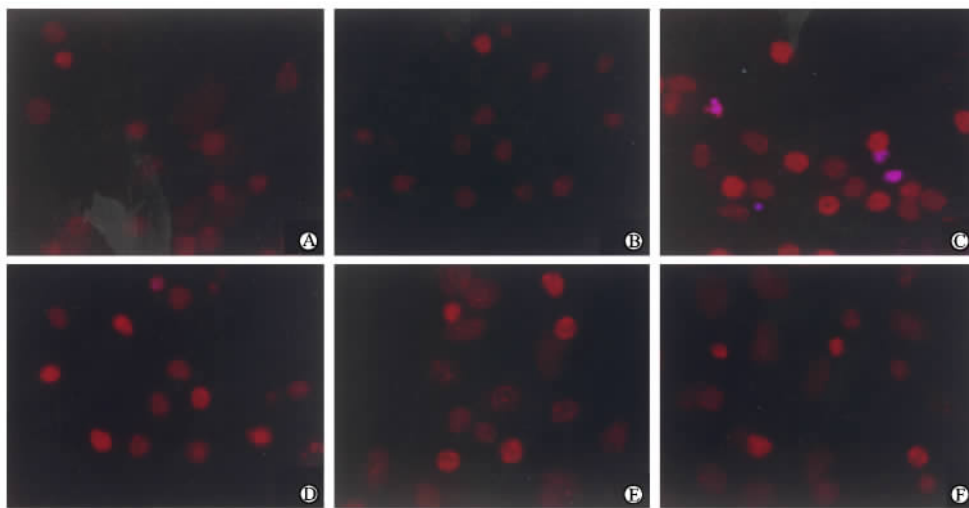


图 1 各组小鼠脊髓神经元 PI/Hoechst33342 双染结果

Fig 1 PI/Hoechst33342 double staining of mouse spinal cord neurons in different groups ($\times 40$)

A: Control group; B: P₅₀ group; C: TNF- α group; D: P₂₅+TNF- α group; E: P₅₀+TNF- α group; F: P₁₀₀+TNF- α group

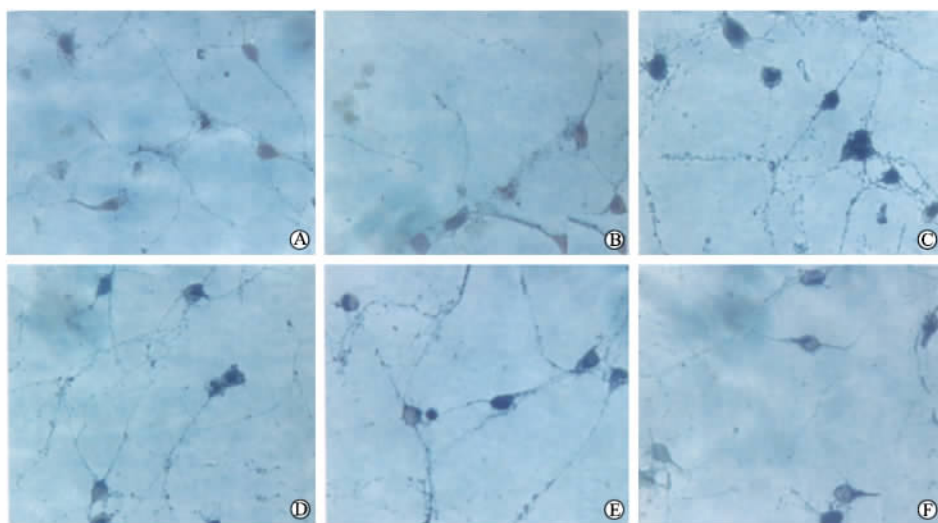


图 2 体外培养小鼠脊髓神经元 *Bax* 免疫细胞化学染色

Fig 2 Immunocytochemical staining of *Bax* in mouse spinal cord neurons *in vitro* ($\times 40$)

A: Control group; B: P₅₀ group; C: TNF- α group; D: P₂₅+TNF- α group; E: P₅₀+TNF- α group; F: P₁₀₀+TNF- α group

3 讨论

1972年, Kerr等^[2]首次提出细胞凋亡的概念, 由于凋亡是一个程序性过程^[3], 可以加以调控, 因而成为研究热点。以往认为, 神经细胞损伤后不会发

生凋亡。但近年来的研究发现, 神经细胞在伤后很长时期内陆续凋亡^[4~7]。肿瘤坏死因子常被用作损伤因子来诱导细胞凋亡^[8], 本研究利用 TNF- α 作为损伤因子, 发现 TNF- α (2 000 U/ml) 可引起小鼠脊髓神经元凋亡, 进一步证实了神经细胞可以发生凋亡。

普鲁泊福是一种新型静脉麻醉药,具有起效快、作用时间短、苏醒迅速而完全、不良反应少等特点,已被广泛用于临床麻醉和镇静治疗。近年来的研究发现,普鲁泊福对多种细胞的凋亡具有抑制作用,普鲁泊福可明显抑制缺血再灌注后的海马区 CA-1 锥体细胞凋亡^[9]。对谷氨酸盐、同型半胱氨酸,过氧化氢诱导的鼠脑皮质神经元凋亡,普鲁泊福有良好的抑制作用^[10]。普鲁泊福对 TNF 诱导的内皮细胞凋亡亦有明显的抑制作用^[11]。本研究发现,普鲁泊福对 TNF- α 诱导的脊髓神经元凋亡具有抑制作用,且随普鲁泊福浓度的增加,抑制作用逐渐增强。普鲁泊福的临床麻醉浓度为 11~28 $\mu\text{mol/L}$ ^[12],在本实验中,25 $\mu\text{mol/L}$ 普鲁泊福即可产生明显的抑制凋亡作用,而高于临床常用浓度的普鲁泊福(50 $\mu\text{mol/L}$ 及 100 $\mu\text{mol/L}$)则显示出了更强的效应,提示麻醉浓度及高于麻醉浓度的普鲁泊福对脊髓神经元凋亡具有积极的保护作用,这对脊髓损伤的保护具有重要的临床指导意义。

凋亡受许多凋亡调控基因表达的影响,如 *p53*、*c-myc* 和 *bcl-2* 家族^[13]。*bcl-2* 家族中的 *Bax* 可诱导细胞凋亡的发生。Huang 等^[14]发现 HL-60 细胞凋亡与 *Bax* 的表达增加有关。本研究也发现, TNF- α 诱导脊髓神经元凋亡的作用与其增加 *Bax* 的表达有关。而经不同浓度的普鲁泊福预处理后再加入 TNF- α 的各组 *Bax* 表达均降低,且随普鲁泊福浓度的增加, *Bax* 表达逐渐降低。这一结果提示,普鲁泊福对脊髓神经细胞凋亡的抑制作用可能与其抑制 *Bax* 表达有关,这从分子水平探讨了普鲁泊福抑制凋亡的机制。但普鲁泊福通过何种途径来抑制 *Bax* 的表达尚有待进一步的研究。

由于细胞凋亡可被兴奋性谷氨酸毒性、自由基损伤和细胞内钙超载等不同机制触发^[15],而已有的研究发现,普鲁泊福具有对抗兴奋性谷氨酸毒性、减轻自由基损伤和降低细胞内钙超载的作用^[16~18],因而普鲁泊福的以上作用均可能参与了其抑制细胞凋亡的作用,但具体机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry[J]. Cytometry, 1992, 13:795-808.
- [2] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26:239-257.
- [3] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407:770-776.
- [4] 傅强,侯铁胜,刘善荣,等.大鼠脊髓压迫性损伤后神经细胞的死亡方式[J].第二军医大学学报,1997,18:557-559.
- [5] Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, et al. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16:186-194.
- [6] Keilhoff G, Fansa H, Wolf G. Neuronal NOS deficiency promotes apoptotic cell death of spinal cord neurons after peripheral nerve transection[J]. Nitric Oxide, 2004, 10:101-111.
- [7] Vincent AM, Mobley BC, Hiller A, et al. IGF-I prevents glutamate-induced motor neuron programmed cell death[J]. Neurobiol Dis, 2004, 16:407-416.
- [8] Robaye B, Mosselmanns R, Fiers W, et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro[J]. Am J Pathol, 1991, 138:447-453.
- [9] Kodaka M, Mori T, Tanaka K, et al. Depressive effects of propofol on apoptotic injury and delayed neuronal death after forebrain ischemia in the rat-comparison with nitrous oxide-oxygen-isoflurane [J]. Masui, 2000, 49:130-138.
- [10] Chang H, Tsai SY, Chang Y, et al. Therapeutic concentrations of propofol protects mouse macrophages from nitric oxide-induced cell death and apoptosis[J]. Can J Anaesth, 2002, 49:477-480.
- [11] 罗涛,夏中元,陈雪君,等.丙泊酚对肿瘤坏死因子诱导的内皮细胞凋亡的影响[J].中华麻醉学杂志,2002,22:619-621.
- [12] Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, et al. The antioxidant potential of propofol (2, 6-diisopropylphenol) [J]. Br J Anaesth, 1992, 68:613-618.
- [13] Sakurai M, Hayashi T, Abe K, et al. Delayed and selective motor neuron death after transient spinal cord ischemia: a role of apoptosis[J]? J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 115:1310-1315.
- [14] Huang ST, Yang RC, Chen MY, et al. Phyllanthus urinaria induces the Fas receptor/ligand expression and ceramide-mediated apoptosis in HL-60 cells[J]. Life Sci, 2004, 75:339-351.
- [15] Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis[J]. J Neurochem, 2004, 90:1281-1289.
- [16] Hara M, Kai Y, Ikemoto Y. Enhancement by propofol of the gamma-aminobutyric acid A response in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat[J]. Anesthesiology, 1994, 81:988-994.
- [17] 夏建华,石学银,曹莉,等.普鲁泊福对大鼠急性脊髓损伤的治疗作用[J].第二军医大学学报,2004,25:1212-1215.
- [18] Amorim P, Chambers G, Cottrell J, et al. Propofol reduces neuronal transmission damage and attenuates the changes in calcium, potassium, and sodium during hyperthermic anoxia in the hippocampal slice[J]. Anesthesiology, 1995, 83:1254-1265.

[收稿日期] 2005-08-29

[修回日期] 2005-10-25

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群