

· 实验研究 ·

右美托咪定对丙泊酚麻醉新生大鼠海马
PI3K/Akt 信号通路的影响

周丽芳 韦祎 吕靖 谢玉波

【摘要】 目的 探讨右美托咪定对丙泊酚麻醉新生大鼠海马磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 80 只, 日龄 7 d, 体重 10~15 g, 随机分为八组: 生理盐水组(N 组)、脂肪乳剂组(I 组)、二甲基亚砜(DMSO)组(D 组)、丙泊酚 100 mg/kg 组(P 组)、右美托咪定 25 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD₂₅ 组)、右美托咪定 50 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD₅₀ 组)、右美托咪定 75 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD₇₅ 组)和 LY294002 25 μ g+右美托咪定 75 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(LYPD 组), 每组 10 只。于大鼠苏醒 2 h 后, 每组取 5 只用电镜观察海马神经元的形态学变化, 剩余 5 只采用 Western blot 法检测海马 Akt 和 pAkt(ser473)蛋白含量。**结果** 八组大鼠 Akt 蛋白含量差异无统计学意义。P 组、PD₂₅ 组、PD₅₀ 组、PD₇₅ 组和 LYPD 组 pAkt(ser473)蛋白含量明显低于 N 组($P < 0.05$); PD₇₅ 组和 LYPD 组 pAkt(ser473)蛋白含量明显高于 P 组($P < 0.05$); LYPD 组 pAkt(ser473)蛋白含量明显低于 PD₇₅ 组($P < 0.05$)。N 组、I 组、D 组大鼠海马神经元的形态结构基本正常; P 组大鼠海马神经元出现细胞核明显肿胀、染色质密度降低、线粒体空泡化等细胞结构损伤表现; PD₂₅ 组、PD₅₀ 组、PD₇₅ 组大鼠海马神经元细胞结构损伤随着右美托咪定剂量的增加而减轻; LYPD 组大鼠海马神经元细胞核固缩, 核膜部分溶解, 染色质凝聚, 线粒体明显空泡变性。**结论** 右美托咪定减轻丙泊酚对发育期大鼠海马神经元的损伤, 其机制可能与其减弱丙泊酚对 PI3K/Akt 信号通路的抑制有关。

【关键词】 右美托咪定; 丙泊酚; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B; 海马

Effects of dexmedetomidine on PI3K/Akt pathway in hippocampus of propofol anesthetized neonatal rats

ZHOU Lifang, WEI Yi, LYU Jing, XIE Yubo. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: XIE Yubo, Email: 1157817791@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of dexmedetomidine on phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway in hippocampus of propofol anesthetized neonatal rats. **Methods** Eighty Sprague-Dawley male rats, aged 7 days, weighing 10-15 g, were randomly divided into 8 groups (n=10 each): normal saline group (group N), DMSO group (group D), intralipid group (group I), propofol group (group P), dexmedetomidine 25 μ g/kg, 50 μ g/kg and 75 μ g/kg + propofol 100 mg/kg groups (groups PD₂₅, PD₅₀ and PD₇₅), LY294002 25 μ g + dexmedetomidine 75 μ g/kg + propofol 100 mg/kg group (group LYPD). The hippocampus of rats in all groups were taken 2 h after the animals fully awake. The ultrastructure of hippocampal neurons was observed by transmission electron microscope. The pAkt-(ser473) protein and Akt protein in the hippocampus were evaluated by Western blot analysis. **Results** There was no significant difference in the expression of Akt protein among the eight groups. Compared with group N, the expression of pAkt (ser473) protein was significantly down-regulated in groups P, PD₂₅, PD₅₀, PD₇₅ and LYPD ($P < 0.05$). Compared with group P, the expression of pAkt (ser473) protein was increased significantly in groups PD₇₅ and LYPD ($P < 0.05$). Compared with group PD₇₅, the expression of pAkt (ser473) protein was significantly down-regulated in group LYPD ($P < 0.05$). The structure of hippocampal neurons was normal in groups N, I and D. Nuclear nuclei swelling, chromatin decreasing and mitochondrion vacuolar degeneration were observed in group P while improved gradually with dexmedetomidine in a dose-dependent manner in groups PD₂₅, PD₅₀ and PD₇₅. Neurons karyopyknosis, partial dissolution of nuclear membrane, chromatin condensation, mitochondria vacuolar degeneration were

基金项目:国家自然科学基金(81373498,81060277);广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1355005-4-2);广西高校科学技术研究项目(2013ZD014)

作者单位:530021 南宁市,广西医科大学第一附属医院麻醉科

通信作者:谢玉波,Email:1157817791@qq.com

observed in group LYPD. **Conclusion** Dexmedetomidine pretreatment provides neuroprotection against propofol-induced hippocampal destruction by preserving PI3K/Akt pathway activity in the developing brains.

【Key words】 Dexmedetomidine; Propofol; Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B; Hippocampal

丙泊酚是临床上最常用的短效静脉麻醉药之一,具有起效快、无明显蓄积、苏醒迅速等优点,广泛用于全身麻醉的诱导和维持。大量研究表明,丙泊酚对大脑处于发育期的哺乳动物具有神经毒性,可促进神经元的凋亡、降低树突棘密度,并导致远期认知功能障碍^[1,2],但其具体机制尚不明确。右美托咪定是临床上常用的高选择性 α_2 肾上腺素受体激动药。有研究表明右美托咪定可以逆转丙泊酚对海马神经元细胞活力的抑制作用,减轻丙泊酚对发育期大脑的毒性作用^[3]。磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路广泛存在于各种神经细胞中,是膜受体信号向细胞内转导的重要途径^[4]。本实验拟观察右美托咪定对丙泊酚麻醉新生大鼠海马 PI3K/Akt 信号通路的影响,以探讨右美托咪定逆转丙泊酚发育期神经毒性的分子机制。

材料与方法

实验动物与分组 选择雄性 SD 大鼠 80 只,日龄 7 d,体重 10~15 g,由广西医科大学动物中心提供。采用随机数字表法将大鼠分为八组:生理盐水组(N组)、脂肪乳剂组(I组)、二甲基亚砜(DMSO)组(D组)、丙泊酚 100 mg/kg 组(P组)、右美托咪定 25 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD₂₅组)、右美托咪定 50 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD₅₀组)、右美托咪定 75 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(PD₇₅组)、LY294002 25 μ g+右美托咪定 75 μ g/kg+丙泊酚 100 mg/kg 组(LYPD组),每组 10 只。

处理方法 N组和I组分别腹腔注射生理盐水和脂肪乳剂 100 mg/kg;D组经侧脑室注射 10% DMSO 5 μ l;P组首次腹腔注射丙泊酚 50 mg/kg,待大鼠翻正反射恢复后(40~60 min),再追加丙泊酚 50 mg/kg^[2];PD₂₅、PD₅₀和 PD₇₅组分别腹腔注射右美托咪定 25、50、75 μ g/kg,30 min 后再给予丙泊酚(处理同 P 组);LYPD 组经侧脑室注射 LY294002 25 μ g(溶于 10% DMSO 5 μ l)30 min 后注射右美托咪定 75 μ g/kg,再 30 min 后给予丙泊酚(处理同 P 组)。

侧脑室注射:参照文献[5],水合氯醛腹腔注射

麻醉幼鼠后,用 5 μ l 微量注射器以颅骨面人字缝为基准点,向头侧移 2.0 mm,向左或右旁开 2.0 mm,进针深度为骨面下 2.0 mm,缓慢注入 10% DMSO 或 LY294002,留针 5 min 防止外渗,缓慢退针,缝合头皮。

透射电镜观察 每组随机选取 5 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 麻醉下,经升主动脉灌注生理盐水约 100 ml,再灌注 2% 多聚甲醛+2.5% 戊二醛(pH 值 7.4)混合固定液约 150 ml。断头取脑,分离海马组织,取 1 mm×1 mm×1 mm 的 CA1 区组织块,放入 4℃ 2.5% 戊二醛中固定 2 h, PBS 冲洗、锇酸固定、乙醇脱水、丙酮脱水、Epon618 环氧树+100% 丙酮浸透,36~60℃ 聚合,制成 50 nm 超薄切片。醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后,采用 H-500 透射电镜下观察海马神经元的超微结构。

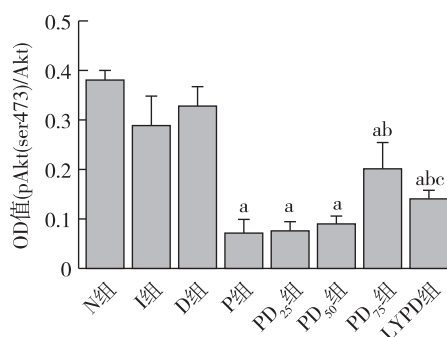
海马 pAkt(ser473)和 Akt 蛋白含量检测 每组取 5 只大鼠,快速断头取海马组织,使用细胞裂解液提取海马组织蛋白,采用 BCA 法测定蛋白含量。取 50 μ g 蛋白加入上样缓冲液使蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳。分离蛋白后转至 PVDF 膜,牛奶封闭 2 h, TBST 洗膜后加入一抗,4℃ 过夜。TBST 洗膜,加入二抗反应 1 h,曝光成像。应用 Image Lab 软件进行分析,以 Akt 条带的灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值表示 Akt 蛋白含量;以 pAkt(ser473)条带的灰度值与 Akt 条带的灰度值的比值表示 pAkt(ser473)蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,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。

结 果

Akt 蛋白表达水平分别为 N 组(1.006 ± 0.115)、I 组(1.139 ± 0.234)、D 组(1.167 ± 0.104)、P 组(1.216 ± 0.124)、PD₂₅ 组(1.309 ± 0.241)、PD₅₀ 组(1.262 ± 0.200)、PD₇₅ 组(1.265 ± 0.236)和 LYPD 组(1.322 ± 0.275),八组间差异无统计学意义。

P 组、PD₂₅ 组、PD₅₀ 组、PD₇₅ 组和 LYPD 组 pAkt (ser473) 蛋白含量明显低于 N 组 ($P < 0.05$); PD₇₅ 组和 LYPD 组 pAkt (ser473) 蛋白含量明显高于 P 组 ($P < 0.05$); LYPD 组 pAkt (ser473) 蛋白含量明显低于 PD₇₅ 组 ($P < 0.05$) (图 1)。



注:与 N 组比较,^a $P < 0.05$;与 P 组比较,^b $P < 0.05$;与 PD₇₅ 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 八组大鼠海马 pAkt (ser473) 蛋白含量的比较

N 组、I 组、D 组大鼠海马神经元的形态结构基本正常,核仁完整、染色质均匀、细胞器结构清晰;P 组大鼠海马神经元出现细胞核明显肿胀、染色质密度降低、线粒体空泡化等细胞结构损伤表现;PD₂₅ 组、PD₅₀ 组、PD₇₅ 组随着右美托咪定剂量的增加,大鼠海马神经元细胞结构损伤减轻,表现为细胞核肿胀现象减少,染色质密度逐渐增高,线粒体结构趋于正常;LYPD 组大鼠海马神经元细胞核固缩,核膜部分溶解,染色质凝聚,线粒体明显空泡变性 (图 2)。

讨 论

临床研究表明,4 岁以下婴幼儿接受全身麻醉

会导致较长时期的行为改变,即学习、记忆功能异常,提示全身麻醉药可能损伤发育期中枢神经系统^[6]。丙泊酚是现今最常用的静脉麻醉药之一,可以通过影响细胞内多种蛋白质表达和信号传导途径诱导发育期大脑神经元凋亡,并损害大鼠成年后学习和记忆功能^[7]。右美托咪定是美托咪定的右旋异构体,通过激动脑和脊髓的 α_2 受体产生镇静、镇痛、抗交感作用,并且对多种脑损伤模型有神经保护作用^[8~10]。本实验显示,丙泊酚 100 mg/kg 可以破坏 7 日龄大鼠的海马神经元结构,而右美托咪定可以剂量依赖性地减轻丙泊酚对海马神经元结构的损伤,说明右美托咪定可以减轻丙泊酚诱导发育期大脑的神经毒性。

PI3K/Akt 信号通路对神经细胞增殖、发育和凋亡具有关键作用。缺血、缺氧和应激等细胞外信号可以激活 PI3K,活化的 PI3K 可以磷酸化 Akt 的 Ser 473 位点从而激活 Akt。PI3K/Akt 通路被激活时,总 Akt 蛋白含量变化不大,但 pAkt (ser473) 表达会增加。pAkt (ser473) 通过激活或者抑制其下游的靶蛋白促进神经细胞生长和抑制神经细胞凋亡^[11]。LY294002 是 PI3K 特异性抑制剂,可以特异性抑制 PI3K 激酶的活性,进而抑制 Akt 激酶的活性。本研究表明,丙泊酚麻醉后,新生大鼠海马 pAkt (ser473) 蛋白含量明显降低,右美托咪定可以剂量依赖性地上调新生大鼠海马 pAkt (ser473) 蛋白的表达,PI3K 抑制剂 LY294002 预处理,可以减弱这种作用,加重丙泊酚对海马神经元细胞的损伤。以上结果显示丙泊酚可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活而损伤新生大鼠海马神经元细胞的形态结构,但是右美托咪定可以剂量依赖性地逆转此抑制作用,从而减轻丙泊酚对新生大鼠海马神

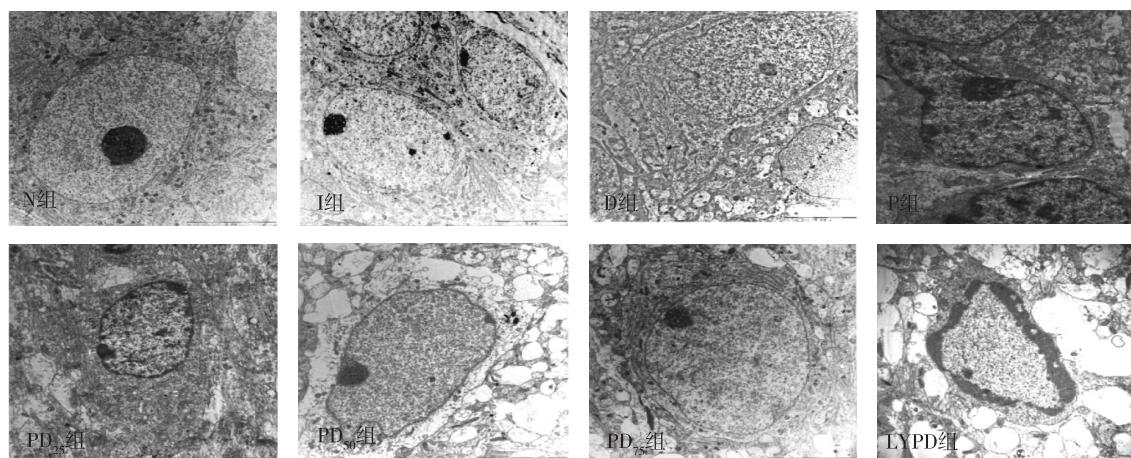


图 2 八组大鼠海马神经元细胞的超微结构 ($\times 10\ 000$)

经元的损伤。

综上所述,右美托咪定能够减轻丙泊酚对发育期大鼠海马神经元的损伤,其机制可能与其减弱丙泊酚对 PI3K/Akt 信号通路的抑制作用有关。

参 考 文 献

- [1] Peam ML, Hu Y, Niesman IR, et al. Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation. *Anesthesiology*, 2012, 116(2): 352-361.
- [2] 杨卫国, 廖淳杰, 谢玉波. 新生大鼠丙泊酚麻醉对成年后海马特异性核蛋白表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(7): 689-692.
- [3] 扈俊华, 梁羽冰, 谢玉波. 右美托咪定预处理对丙泊酚孵育的大鼠海马神经元细胞活力的影响. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(5): 488-490.
- [4] Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, 2008, 432(2): 146-150.
- [5] Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci*, 2000, 20(15): 5775-5781.
- [6] DiMaggio C, Sun LS, Li G. Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort. *Anesth Analg*, 2011, 113(5): 1143-1151.
- [7] 贺丹, 陶毓嫣, 谢玉波, 等. 丙泊酚麻醉对新生大鼠海马 PKA-CREB 信号通路的影响. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33(10): 1198-1201.
- [8] Eser O, Fidan H, Sahin O, et al. The influence of dexmedetomidine on ischemic rat hippocampus. *Brain Res*, 2008, 1218: 250-256.
- [9] Duan X, Li Y, Zhou C, et al. Dexmedetomidine provides neuroprotection: impact on ketamine-induced neuroapoptosis in the developing rat brain. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2014, 58(9): 1121-1126.
- [10] Xiong B, Shi QQ, Miao CH. Dexmedetomidine renders a brain protection on hippocampal formation through inhibition of nNOS-NO signaling in endotoxin-induced shock rats. *Brain Inj*, 2014, 28(7): 1003-1008.
- [11] Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, et al. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2009, 467(1): 30-35.

(收稿日期:2016-5-27)

· 读者·作者·编者 ·

《临床麻醉学杂志》中英文摘要撰写规范

论著文章须有中、英文摘要,内容必须包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)四个部分,目的主要是回答为什么进行此项研究,说明提出问题的理由,表明研究的范围和重要性。方法中应简要说明研究课题的基本设计,所用的原理,条件,对象,材料,设备,如何分组对照,研究范围精确度,观察的指标等。结果部分应写出本研究的主要数据,被确定的关系,观察结果,得到的效果,有何新发现。结论是结果内容的升华,是由结果推论而出,是结果的分析,研究的比较,评价,应用,假设,启发,建议及预测等。摘要应具有独立性,即不阅读全文就能获得必要的信息,采用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等主语,不加评论和解释,摘要中首次出现的缩略语、代号等,非公认公知者,须注明全称。考虑篇幅的限制,中文摘要可简略些,一般 300~500 字左右,英文摘要与中文摘要原则上相对应,考虑到国外读者的需要,可更详细,一般 500 个实词左右。英文摘要尚应包括文题(仅第一个字母大写)、所有作者姓名(姓在前,名在后;姓全大写,名字仅首字母大写)、第一作者单位名称和科室、所在城市名、邮政编码及国名。