

· 实验研究 ·

抗氧化剂 MitoQ 对异氟醚诱导大鼠海马神经元损伤的影响及机制

明少鹏 周凤坤

【摘要】 目的 探讨抗氧化剂 MitoQ 对异氟醚诱导的新生大鼠海马神经元细胞损伤的影响及潜在机制。**方法** SPF 级健康 SD 大鼠 15 只, 7 日龄, 体重 15~20 g。采用随机数字表法分为三组: 对照组(C 组)、异氟醚组(I 组)和异氟醚+MitoQ 组(IM 组), 每组 5 只。C 组吸入空-氧混合气体。I 组于出生后 7、14 和 21 d 吸入 1.5% 异氟醚 2 h, IM 组在每次吸入异氟醚前腹腔注射 MitoQ 0.4 ml/kg。于出生后 28 d 采用 HE 染色观察各组大鼠海马 CA1 区海马神经元细胞形态。分离培养新生大鼠原代海马神经元细胞培养并分组处理, 采用 MTT 法和 TUNEL 原位荧光染色法检测细胞存活率和凋亡率; 采用硫代巴比妥酸法和黄嘌呤氧化酶法检测细胞中丙二醛(MDA)浓度和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 采用 Rhodamine 123 染色荧光显微镜照相法检测线粒体膜电位(MMP), DCFH-DA 染色荧光显微镜照相法检测细胞内活性氧簇(ROS)生成量, 采用 Western blot 法检测海马神经元细胞中 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白含量。**结果** 与 C 组比较, I 组大鼠海马组织神经细胞受损明显, 细胞数目减少, I 组细胞存活率明显降低, 细胞凋亡率明显升高, MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显降低, ROS 生成量明显增加, MMP 水平明显降低, Bax 和 caspase-3 蛋白含量明显升高, Bcl-2 蛋白含量明显降低($P<0.05$); 与 I 组比较, IM 组大鼠海马组织神经细胞损伤减少, 细胞存活率明显升高, 细胞凋亡率明显降低, MDA 浓度明显降低, SOD 活性明显升高, ROS 生成量明显减少, MMP 水平明显升高, Bax 和 caspase-3 蛋白含量明显降低, Bcl-2 蛋白含量明显升高($P<0.05$)。**结论** 抗氧化剂 MitoQ 可明显抑制异氟醚诱导的海马神经元细胞损伤, 这与其拮抗细胞氧化应激和维持线粒体功能作用密切相关。

【关键词】 MitoQ; 异氟醚; 海马神经元细胞; 凋亡

Protection effects and mechanism of antioxidant MitoQ on isoflurane-induced injury of hippocampal neurons in rats MING Shaopeng, ZHOU Fengkun. Department of Anesthesiology, Ruikang Hospital

Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China

Corresponding author: MING Shaopeng, Email: shaopengmingmz@163.com

【Abstract】 Objective To explore the impacts and potential mechanisms of MitoQ on isoflurane-induced injury of primary cultured hippocampal neurons in newborn rats. **Methods** Fifteen healthy SPF Sprague-Dawley rats of both sex were randomly divided into three groups ($n=5$ each) using a random number table: control group (group C), multiple exposures to isoflurane anesthesia group (group I) and multiple exposures to isoflurane anesthesia+MitoQ group (group IM). On postnatal days 7, 14 and 21, 1.5% isoflurane was inhaled for 2 h in group I. MitoQ was intraperitoneally administered in a volume of 0.4 ml/kg before isoflurane anesthesia in group IM, while a mixture of oxygen and air was inhaled instead of isoflurane in group C. HE staining was carried out on postnatal day 28 to observe the morphological changes in hippocampal CA1 region of rat neural cell structures. Hippocampal neuron cells were dissected from clean Sprague-Dawley rats born in 24 h. After primary culture for seven days, MTT assay and TUNEL assay was respectively performed to measure the cell viability and apoptosis of hippocampal neurons. The malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were detected respectively using the thiobarbituric method and xanthinoxidase method. Mitochondrial membrane potential (MMP) was measured by rhodamine 123 staining, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were tested by DCFH-DA staining. Western blot was used to analyze the protein levels of Bax, Bcl-2 and caspase-3. **Results** Compared with group C, group I decreased the number of neural cells and the cell survival rate; the apoptotic rate was significantly increased; MDA contents and ROS production were significantly increased; SOD activity and

作者单位: 530011 南宁市, 广西中医药大学附属瑞康医院麻醉科(明少鹏), 神经内科(周凤坤)

通信作者: 明少鹏, Email: shaopengmingmz@163.com

MMP level were significantly decreased; the expression of Bax and caspase-3 were significantly increased, while the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the group I, the damaged neural cells were decreased, the cell survival rate was significantly increased, the apoptotic rate was significantly decreased in group IM; MDA contents and ROS production were significantly decreased; SOD activity and MMP level were significantly increased; the expression of Bax and caspase-3 were significantly decreased, while the expression of Bcl-2 was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Antioxidant MitoQ attenuates isoflurane-induced neuron damage, which may be associated with the inhibition on oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

【Key words】 MitoQ; Isoflurane; Hippocampal neuron cells; Apoptosis

异氟醚是一种常用的吸入麻醉药,可导致哺乳类动物发育期大脑神经细胞损伤并损害幼年和成年时期的空间学习记忆^[1,2],诱导海马神经元细胞凋亡是异氟醚产生神经毒性的主要机制之一^[3]。线粒体靶向抗氧化剂 MitoQ 是泛癸利酮的一种合成类似物,能靶向聚集于线粒体中清除过度生成的氧自由基^[4]。MitoQ 在以线粒体功能障碍和氧化应激损伤为主要病理表现的神经系统疾病(如脑缺血、阿尔茨海默病、帕金森病、弗里德赖希共济失调、多发性硬化)中均具有一定的作用^[5,6]。MitoQ 是否能够影响异氟醚诱导的神经细胞损伤,目前尚无相关研究。本研究探索 MitoQ 在异氟醚诱导的大鼠海马神经元细胞损伤中的作用,从而为其在预防麻醉损伤中的临床应用提供实验基础。

材料与方法

实验材料 异氟醚(批号:120701),MitoQ(批号:130802),多聚赖氨酸、牛血清白蛋白、 β -Tubulin III 单克隆抗体、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO),DMEM/F12 培养基、Neurobasal 培养基和 B27 supplement,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒,荧光探针 DCFH-DA 活性氧检测试剂盒和线粒体膜电位荧光探针 Rhodamine 123 检测试剂盒,山羊抗小鼠 FITC 标记 IgG 二抗, TUNEL 试剂盒, Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 单克隆抗体。

实验动物与分组 SPF 级健康 SD 大鼠 15 只,雌雄不拘,7 日龄,体重 15~20 g,动物合格证号为 SCXK(京)-2013-006。采用随机数字表法分为三组:对照组(C 组)、异氟醚组(I 组)和异氟醚+MitoQ 组(IM 组),每组 5 只。C 组吸入空-氧混合气体,I 组于出生后 7、14 和 21 d 时吸入 1.5%异氟醚 2 h,IM 组在每次吸入异氟醚前腹腔注射 MitoQ 0.4 ml/kg(5 mg/kg)。

大鼠海马 CA1 区神经元细胞形态检测 各组大鼠于出生后 28 d 处死分离海马组织,4℃条件下

4%多聚甲醛磷酸缓冲液中固定过夜,之后进行常规脱水、二甲苯透明并石蜡包埋,蜡块连续冠状切片,片厚 4 μ m,每隔 5 张取 1 张切片,在温水中充分展开,贴到经多聚赖氨酸处理过的玻璃片上。每个蜡块各取 2 张行 HE 染色。

原代大鼠皮层神经细胞元细胞培养、鉴定并分组 取 24 h 内新生 SD 大鼠 5 只处死分离脑组织,显微镜下剥离血管和脑膜,置于 2 ml 解剖液中,用剪刀将皮层结构剪碎成约 1 mm³ 的小块,加入 2 ml 0.125%胰酶,置于 37℃的 CO₂ 细胞培养箱中消化 25 min。离心弃上清,加 4 ml 接种培养基终止消化,反复吹打并收集上清,以 200 目孔径的细胞筛过滤上清,获得单个细胞的悬液。调整细胞浓度 5×10^5 个/ml 接种于预处理多聚赖氨酸的培养皿中,置于 5%CO₂ 的 37℃培养箱中培养。接种 24 h 后将接种培养基更换为维持培养基继续培养,以后每隔 2 天换一半液体,培养至第 7 天后神经元细胞成熟。4%多聚甲醛固定 15 min,1% H₂O₂ 处理 10 min。0.3% Triton X-100 透化 10 min,封闭液封闭 1 h, β -Tubulin III 抗体(1:50)4℃过夜。FITC 标记 IgG 二抗(1:200)孵育 1 h 避光。滴加 1:4 000 稀释的 Hoechst 33258 一滴,孵育 5 min。荧光显微镜下观察神经元细胞鉴定染色结果。细胞根据不同处理分为三组:C 组(常规培养,不加处理);I 组(细胞培养皿置入 Billups-Rothenburg 容器,并向注气口通入 2%异氟醚,以 6 L/min 速度通气 10 min,在容器的出气口使用 Ohmeda 气体监测仪测定异氟醚浓度,确保异氟醚浓度达到 2%,37℃培养 6 h);IM 组(在细胞培养基中加入终浓度为 0.1 μ mol/L 的 MitoQ,其余处理同 I 组)。

细胞存活率检测 调整细胞浓度以 5×10^4 个/ml接种于 96 孔板中,同时设定阴性对照孔(即不加细胞按照同步步骤处理),每组各细胞孔中加入 20 μ l 的 MTT 溶液 5 mg/L,37℃下培养 4 h,弃去上清后,加 150 μ l 的 DMSO 溶液,振荡反应 10 min,酶标仪上测定各孔在 590 nm 处的光密度

(OD)值。每组同时设置 5 个重复孔。各组神经元的存活率(%)=(处理组 OD-阴性对照孔 OD)/(空白对照组 OD-阴性对照孔 OD)×100%。

细胞凋亡检测 调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml 并接种于铺有盖玻片的 24 孔板中, PBS 洗去培养液, 加入 1 ml 4% 多聚甲醛固定 20 min, 风干后用含 3% H_2O_2 的 PBS 室温封阻 10 min, PBS 清洗 3 次, 加入 0.1% Triton-X100 冰上透膜 10 min, 滴加 20 μ l TUNEL 染色液(试剂 1 和试剂 2 按 1:9 冰上混匀)室温避光孵育 90 min, 进行 Hoechst 33258 染核 5 min 后 PBS 冲洗 3 次, 最后抗荧光淬灭封片液封片并拍照观察。每个盖玻片选取 4 个视野, TUNEL 染色阳性呈绿色, 代表视野中凋亡细胞, Hoechst 33258 染色阳性呈蓝色, 代表视野中总细胞数, 以 TUNEL 染色阳性细胞数与细胞总数比值计算凋亡率。

MDA 浓度和 SOD 活性测定 按照试剂盒说明分别采用硫代巴比妥酸法和黄嘌呤氧化酶法测定细胞中 MDA 浓度和 SOD 活性。

细胞线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 水平测定 将待测组神经元细胞按照 5×10^5 个/ml 接种于 24 孔板中, 用 PBS 清洗 2 次, 洗除培养液, 加入 250 μ l 培养液, 再加入 250 μ l 染色工作液, 37℃ 避光孵育 30 min 用 PBS 冲洗 3 次。加入 500 μ l 细胞培养液, 用酶标仪检测其荧光强度进行定量分析。

细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 生成量检测 按照试剂盒的操作步骤, 将神经元以 5×10^5 个/ml 接种于 96 孔板, 按实验设计处理后用 PBS 洗去培养基, 每孔加入 DCF 试剂(用无血清培养液按照 1:1 000 稀释)100 μ l, 37℃ 避光孵育 20 min。PBS 洗去 DCF 试剂后运用酶标仪检测荧光强度(激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

细胞中 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白含量的检测 收获各组细胞, 加裂解液提取蛋白, BCA 法进行总蛋白定量。调整上样量为 25 μ g 总蛋白/样本,

上样, 电泳, 转膜, 封闭过夜。封闭完毕后 PBS 洗膜 5 次, 分别加一抗(所用一抗稀释比例分别为 Bax 抗体 1:1 000、Bcl-2 抗体 1:1 000、caspase-3 抗体 1:2 000), 37℃ 反应 1.5 h, PBS 洗膜 5 次, 加辣根过氧化物酶标记二抗, 37℃ 反应 1 h, PBS 洗膜 5 次。染色, 曝光, 采用 BIORAD GELDOC XR 凝胶成像系统依次显影、定影, Quantity One Basic 软件分析胶片蛋白条带。

统计分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。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, 两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

海马 CA1 区神经元细胞形态 C 组大鼠海马 CA1 区神经细胞排列整齐, 染色清晰, 形态完整; I 组大鼠海马 CA1 区神经细胞数量明显减少, 神经细胞受损缺失, 细胞核固缩, 部分神经细胞呈现出月牙型、多齿形等凋亡形态; IM 组大鼠海马 CA1 区神经细胞核固缩现象明显改善, 形态较规则, 排列较整齐(图 1)。

细胞存活率 三组细胞存活率分别为: C 组 100%、I 组 $21.73\% \pm 2.11\%$ 、IM 组 $48.66\% \pm 3.10\%$ 。I 组细胞存活率明显低于 C 组 ($P < 0.05$); IM 组细胞存活率明显高于 I 组 ($P < 0.05$)。

细胞凋亡 三组细胞凋亡率分别为: C 组 $9.65\% \pm 0.23\%$ 、I 组 $30.25\% \pm 2.38\%$ 、IM 组细胞凋亡率 $20.18\% \pm 1.56\%$ 。I 组细胞凋亡率明显高于 C 组 ($P < 0.05$); IM 组细胞凋亡率明显低于 I 组 ($P < 0.05$)。

氧化应激和 MMP 水平 与 C 组比较, I 组细胞 MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显下降, ROS 相对生成量明显增加, MMP 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 I 组比较, IM 组细胞 MDA 浓度明显降低, SOD 活性明显升高, ROS 相对生成量明显降低, MMP 水平明显增加 ($P < 0.05$) (表 1)。

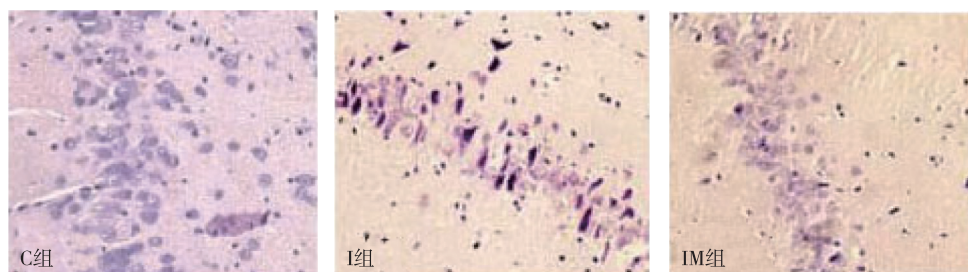


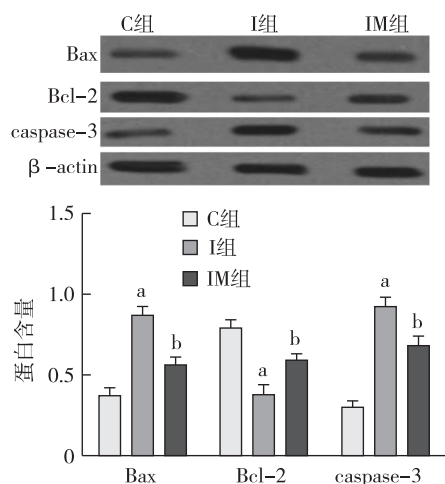
图 1 三组大鼠海马 CA1 区 HE 染色图 (×400)

表 1 各组细胞中氧化应激水平和 MMP 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	ROS 相对生成量	MMP 相对水平
C 组	8.236 $\pm$ 0.178	28.192 $\pm$ 0.685	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.09
I 组	15.269 $\pm$ 0.714 ^a	16.369 $\pm$ 0.729 ^a	2.34 $\pm$ 0.56 ^a	0.45 $\pm$ 0.08 ^a
IM 组	10.183 $\pm$ 0.576 ^b	20.374 $\pm$ 0.258 ^b	1.78 $\pm$ 0.26 ^b	0.69 $\pm$ 0.06 ^b

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 I 组比较,^b $P < 0.05$

Bax/Bcl-2 和 caspase-3 蛋白含量 与 C 组比较,I 组细胞 Bax 和 caspase-3 蛋白含量明显升高,Bcl-2 蛋白含量明显降低($P < 0.05$);与 I 组比较,IM 组细胞 Bax 和 caspase-3 蛋白含量明显降低,Bcl-2 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)(图 2)。



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 I 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 三组细胞 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白含量的比较

讨 论

本研究动物模型实验中发现大鼠经过反复多次异氟醚麻醉处理后发现海马组织 CA1 区神经元细胞损伤明显,凋亡增多,而麻醉之前 MitoQ 预处理能够明显减少异氟醚诱导的神经元细胞凋亡,这表明 MitoQ 能够改善异氟醚对神经元细胞的损伤。因此本研究进一步在体外细胞实验探讨 MitoQ 保护异氟醚诱导神经元细胞损伤的机制。

神经元细胞的凋亡是异氟醚诱发神经细胞毒性的主要机制之一^[7]。本实验中发现异氟醚明显抑制神经元细胞的存活率,诱导细胞的凋亡。线粒体是控制细胞凋亡的中心和产生氧自由基的主要场所,蓄积的氧自由基可以导致线粒体膜脂质过氧化,功能蛋白结构变异变性以及线粒体 DNA 突变

断裂、碱基改变、DNA 解聚和分子交联等氧化损伤,导致线粒体功能障碍^[8],进而促进线粒体呼吸链大量活性氧的生成和线粒体抗氧化系统功能的降低,致使线粒体凋亡途径被激活,最终导致细胞的凋亡和坏死^[9]。

MDA 作为机体脂质过氧化反应终产物,能够反映细胞受氧自由基损伤的程度,而 SOD 作为抗氧化酶,其活性高低反映机体抗氧化能力^[10]。本研究结果显示异氟醚诱导能够增加细胞中 MDA 含量,降低 SOD 活性,促进细胞中 ROS 生成,降低线粒体膜电位。因此推断异氟醚诱导海马神经元细胞的凋亡可能与诱导细胞氧化应激和线粒体功能障碍有关。作为泛癸利酮的结构类似物,MitoQ 具有清除 ROS 和保护生物膜的作用。Wani 等^[11]研究表明,MitoQ 可通过减少 ROS 产物,增加锰-超氧化物歧化酶活性及谷胱甘肽水平来抑制氧化应激反应。本研究中异氟醚诱导之前采用 MitoQ 预处理神经元细胞,能够升高细胞存活率,降低凋亡率和氧化应激水平,同时升高线粒体膜电位,这表明 MitoQ 能够减少氧化应激和改善线粒体功能障碍以拮抗异氟醚诱导的神经元细胞凋亡。

Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡的一个关键的调节因素,同时对维持正常的线粒体膜电位至关重要^[12]。促凋亡蛋白 Bax、Bak 等蛋白的激活将进一步直接或间接地钝化抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白,也可发生寡聚化并定位于线粒体膜上,促使细胞色素 C 到细胞浆启动线粒体凋亡途径,最终激活 caspase-3 和细胞的凋亡^[13]。在异氟醚对神经元细胞凋亡机制探讨中,本研究结果显示异氟醚上调 Bax 和 caspase-3 表达,抑制 Bcl-2 表达,而 MitoQ 明显抑制 Bax 和 caspase-3 的表达,升高 Bcl-2 表达。这表明 Bax/Bcl-2 平衡在异氟醚诱导神经元细胞凋亡中发挥调控作用,同时 MitoQ 对异氟醚诱导神经元细胞凋亡的保护作用与维持 Bax/Bcl-2 分子平衡密切相关。

综上所述,抗氧化剂 MitoQ 能够拮抗异氟醚诱导的神经元细胞氧化应激和线粒体功能障碍,减少细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] Bi J, Zhang H, Lu J, et al. Nobiletin ameliorates isoflurane-induced cognitive impairment via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in aging rats. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5408-5414.
- [2] Sen T, Sen N. Isoflurane-induced inactivation of creb through histone deacetylase 4 is responsible for cognitive impairment in developing brain. *Neurobiol Dis*, 2016, 96: 12-21.
- [3] Si Y, Zhang Y, Han L, et al. Dexmedetomidine acts via the jak2/stat3 pathway to attenuate isoflurane-induced neurocognitive deficits in senile mice. *PLoS One*, 2016, 11: e0164763.
- [4] Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J*, 2015, 29(12): 4766-4771.
- [5] Kumar A, Singh A. A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in alzheimer's disease and other neurological conditions. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 206.
- [6] Ng LF, Gruber J, Cheah IK, et al. The mitochondria-targeted antioxidant mitoq extends lifespan and improves healthspan of a transgenic caenorhabditis elegans model of alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 2014, 71: 390-401.
- [7] Zhang Y, Li D, Li H, et al. Taurine pretreatment prevents isoflurane-induced cognitive impairment by inhibiting er stress-mediated activation of apoptosis pathways in the hippocampus in aged rats. *Neurochem Res*, 2016, 41(10): 2517-2525.
- [8] Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*, 2003, 348(14): 1365-1375.
- [9] Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ros) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000, 5(5): 415-418.
- [10] Yu J, Wei J, Ji L, et al. Exploration on mechanism of a new type of melatonin receptor agonist neu-p11 in hypoxia-reoxygenation injury of myocardial cells. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 999-1003.
- [11] Wani WY, Gudup S, Sunkaria A, et al. Protective efficacy of mitochondrial targeted antioxidant mitoq against dichlorvos induced oxidative stress and cell death in rat brain. *Neuropharmacology*, 2011, 61(8): 1193-1201.
- [12] Cui S, Sun Y, Liu C. Effect of bushenyisui formula on brain tissue apoptosis and bcl-2 in beta-amyloid protein-induced alzheimer's disease rat models. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(4): 646-650.
- [13] Venkatesan RS, Sadiq AM. Effect of morin-5'-sulfonic acid sodium salt on the expression of apoptosis related proteins caspase 3, bax and bcl 2 due to the mercury induced oxidative stress in albino rats. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 202-208.

(收稿日期:2016-12-20)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》对来稿署名的要求

作者姓名在文题下方按序排列,一般不宜超过 6 位。排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作更换,如欲更换第一作者,需出具单位证明和由全体作者签名的申请。作者单位的邮编、所在城市、单位名称的全称和科室在首页脚注中说明。若其他作者不属同一单位,需写出各自单位,并在单位后用括号列出作者的姓名。作者应具备的条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析和解释;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术上进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。“通信作者”系指研究生课题论文的导师或直接指导者、相关科研项目课题负责人及该文的主要责任者和联系者。“通信作者”对论文应具有与第一作者同等的权利和义务。