

· 实验研究 ·

Fas/FasL 在罗哌卡因致 PC12 细胞凋亡中的表达

罗昭 刘颖 张杨 孙晓东 桑明 罗辉宇

【摘要】 目的 检测 Fas、FasL 在罗哌卡因诱导 PC12 细胞凋亡中表达的变化,探讨罗哌卡因的神经毒性机制。**方法** 采用不同浓度罗哌卡因(0.1、0.5、1、2、4 mmol/L)处理 PC12 细胞 24 h 以建立细胞的神经毒性模型,CCK-8 法测定细胞活力。最终将细胞随机分为三组:0.5 mmol/L 组、2 mmol/L 组和正常对照组。各组细胞培养 24 h 后用光学显微镜观察细胞形态学变化(加上 1 mmol/L 组),流式细胞仪检测细胞凋亡,免疫荧光检测 Fas、FasL 表达。**结果** 与正常对照组比较,0.5 mmol/L 组和 2 mmol/L 组细胞活力明显降低($P < 0.05$),细胞形态明显异常(包括 1 mmol/L 组),凋亡率明显升高($P < 0.05$),Fas、FasL 表达明显增强($P < 0.05$);与 0.5 mmol/L 组比较,2 mmol/L 组细胞凋亡率和 Fas、FasL 表达明显增加($P < 0.05$)。**结论** 罗哌卡因可诱导 PC12 细胞凋亡,其机制可能与 Fas/FasL 上调有关。

【关键词】 罗哌卡因;PC12 细胞;细胞凋亡;Fas;FasL

Expression of Fas/FasL in PC12 cell apoptosis induced by ropivacaine LUO Zhao, LIU Ying, ZHANG Yang, SUN Xiaodong, SANG Ming, LUO Huiyu. Department of Anesthesiology, Xiangyang No.1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, China
Corresponding author: LUO Huiyu, Email: 603983267@qq.com

【Abstract】 Objective To detect the expression of Fas and FasL in ropivacaine-induced rat pheochromocytoma (PC12) cells apoptosis and the mechanism of its neurotoxicity. **Methods** PC12 cells were treated with different concentrations of ropivacaine (0.1, 0.5, 1, 2, and 4 mmol/L) for 24 h to establish a cellular neurotoxicity model, and the cell viability were assessed by CCK-8. The cells were finally divided into 3 groups randomly: 0.5 mmol/L group, 2 mmol/L group and control group. After the cells were cultured for 24 h, morphological changes of cells were observed under optical microscope (add the 1 mmol/L group), apoptosis was assessed by flow cytometer, the expression of Fas and FasL were assessed by immunofluorescence. **Results** Compared with the control group, the cell viability of 0.5 mmol/L and 2 mmol/L group decreased significantly ($P < 0.05$), the cells exhibited obvious morphologic abnormalities (including the 1 mmol/L group), the apoptotic rate increased significantly ($P < 0.05$), the expression of Fas and FasL increased significantly ($P < 0.05$); Compared with 0.5 mmol/L group, the apoptotic rate and expression of Fas, FasL of 2 mmol/L group increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Ropivacaine exposure induces apoptosis in PC12 cells, which might be related with the up-regulation of Fas/FasL.

【Key words】 Ropivacaine; PC12 cells; Apoptosis; Fas; FasL

罗哌卡因是一种有感觉、运动阻滞分离特点的局麻药,广泛应用于临床^[1]。但大多数局麻药,包括罗哌卡因都有潜在的神经毒性^[2],其确切机制尚不明确,可能与细胞凋亡有关^[3]。研究表明,Fas/FasL 途径参与了脊髓损伤后神经细胞凋亡的调控^[4,5],但与局麻药导致的神经细胞凋亡是否存在

相关性,目前尚不清楚。因此,本研究拟以 PC12 细胞作为研究对象,探讨罗哌卡因导致的神经细胞凋亡是否与 Fas/FasL 有关。

材料与方法

主要药品、试剂与仪器 甲磺酸罗哌卡因;RPMI-1640 培养基;胎牛血清;胰蛋白酶;双抗;DMSO;Triton X-100;4% 多聚甲醛;CCK-8 试剂盒;Annexin V-FITC/PI 试剂盒;兔抗大鼠 Fas、FasL 多克隆抗体;免疫荧光染色试剂盒-抗兔

DOI:10.12089/jca.2018.04.014

作者单位:441000 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院麻醉科(罗昭、刘颖、张杨、罗辉宇),中心实验室(孙晓东、桑明)

通信作者:罗辉宇,Email:603983267@qq.com

FITC; DAPI 染液; 酶标仪; 荧光显微镜; 流式细胞仪。

细胞培养 PC12 细胞株购于中国科学院上海细胞库, 在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 完全培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。每 2~3 天换液一次, 细胞密度到 80% 左右时, 用胰酶进行消化传代。

CCK-8 法测定细胞活力 将细胞接种于 96 孔板中, 5×10³/孔, 待细胞融合至 80% 左右时进行实验。细胞随机分为六组, 分别用 0.1、0.5、1、2、4 mmol/L 罗哌卡因处理 24 h, 对照组为不含罗哌卡因的完全培养基, 每组设 5 个复孔。采用 CCK-8 法测定细胞活力, 以含培养基和 CCK-8 溶液, 但无细胞的孔作为空白孔调零。取 5 个复孔的平均值, 以对照组细胞活力为 100%, 计算各组细胞活力 = 实验孔 OD 值 ÷ 对照孔 OD 值 × 100%, 并确定罗哌卡因的半数抑制浓度 (IC₅₀)。

实验分组与处理 根据 CCK-8 结果将细胞随机分为三组: 0.5 mmol/L 组、2 mmol/L 组和对照组, 细胞融合至 80% 左右时分别用 0.5 mmol/L 和 2 mmol/L 罗哌卡因处理 PC12 细胞 24 h, 对照组不含罗哌卡因。

PC12 细胞形态学观察 为了更清楚地看到罗哌卡因引起的细胞形态变化, 在上述分组的基础上加上 1 mmol/L 组, 将细胞接种于 12 孔板中, 1×10⁵/孔, 每组 3 个复孔。进行上述分组和处理后在显微镜下观察细胞形态, 每孔随机选 3 个视野进行拍照。

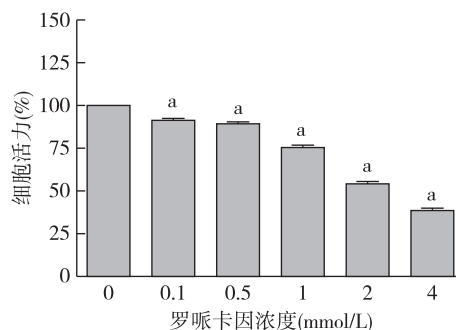
流式细胞仪检测细胞凋亡 按照上述分组和处理, 以流式细胞仪计数 10 000 个细胞, 检测细胞凋亡情况。同时, 以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。该实验重复 3 次。

免疫荧光检测 Fas/FasL 表达 将细胞接种于 24 孔板中, 5×10⁴/孔, 按照上述分组和处理, 再进行固定、通透、封闭等步骤; 然后孵育兔抗大鼠 Fas、FasL 一抗 (1:100) 和 FITC 标记的二抗 (1:200), DAPI (1:1 000) 染核; 以 PBS 代替一抗或二抗作为阴性对照, 在荧光显微镜下观察, 以细胞出现绿色荧光为阳性结果。该实验重复 3 次, Image J 分析并比较各组平均荧光强度。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件处理数据。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

CCK-8 法测定细胞活力 与对照组比较, 各浓度组细胞经罗哌卡因处理 24 h 后, 细胞活力明显降低 (P < 0.05) (图 1)。罗哌卡因对 PC12 细胞的损伤呈浓度依赖性, IC₅₀ = 2.546 mmol/L。



注: 与 0 mmol/L 比较, *P < 0.05

图 1 不同浓度罗哌卡因对 PC12 细胞活力的影响

细胞形态学改变 显微镜下见正常培养的 PC12 细胞呈多角形, 有突起, 分布成网络, 表现出一系列神经元的特征。实验组不同浓度罗哌卡因处理 PC12 细胞 24 h 后, 可见细胞变圆, 突起回缩或消失, 细胞完整性被破坏 (图 2)。

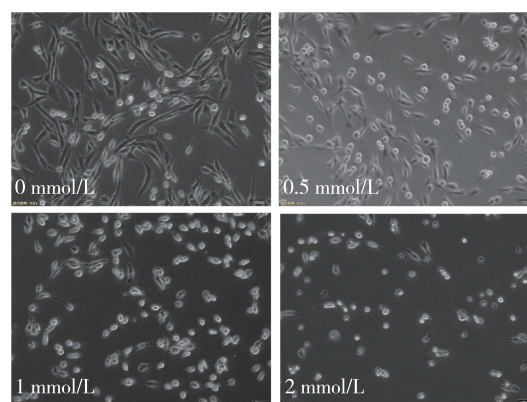


图 2 不同浓度罗哌卡因引起的 PC12 细胞形态学改变 (×200)

细胞凋亡 以早期和晚期凋亡细胞百分数之和为总凋亡率, 与对照组比较, 0.5 mmol/L 和 2 mmol/L 组细胞凋亡率明显升高 (P < 0.05); 与 0.5 mmol/L 组比较, 2 mmol/L 组细胞凋亡率明显升高 (P < 0.05) (图 3)。

Fas/FasL 蛋白的表达 对照组细胞几乎无表达, 0.5 mmol/L 组表达较少, 2 mmol/L 组表达较多

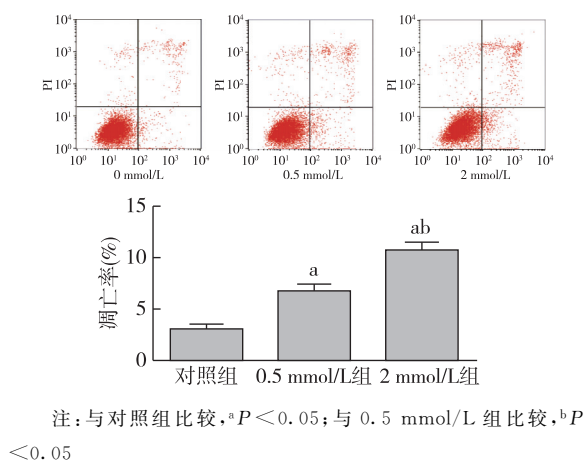


图3 不同浓度罗哌卡因致 PC12 细胞凋亡的比较 (Annexin V/PI 染色)

(图 4,5)。与对照组比较,0.5 mmol/L 和 2 mmol/L 组 Fas/FasL 平均荧光强度明显增加($P < 0.05$);与 0.5 mmol/L 组比较,2 mmol/L 组 Fas/FasL 平均荧光强度明显增加($P < 0.05$) (图 6)。

讨 论

局麻药的神经毒性机制及其防治一直是研究的热点。本实验细胞选择了大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞,此细胞不仅形态与正常神经细胞相似,而且生理、生化功能也与正常神经细胞相似,被广泛应用于神经毒性研究^[6]。本研究结果显示,罗哌卡因呈浓度依赖性引起 PC12 细胞损伤和凋亡;Fas、FasL 表达也随罗哌卡因浓度的增加而增加,这

与临床麻醉中神经毒性发生与局麻药使用浓度的关系一致。凋亡是神经毒性的主要病变基础,本实验中 0.5 和 2 mmol/L 罗哌卡因处理 PC12 细胞 24 h 后,凋亡率和 Fas、FasL 表达都增加,由此推断:罗哌卡因可能是通过上调 Fas/FasL 表达,并经 Fas/FasL 途径参与其神经毒性的发生。

局麻药的神经毒性机制是多因素调控的过程,具有复杂而独特的信号系统,不同局麻药的神经毒性机制不尽相同,但多与细胞凋亡有关。经典的细胞凋亡主要有 2 条途径,即细胞膜上的死亡受体途径和细胞内的线粒体途径。本实验中的 Fas/FasL 途径就是死亡受体途径。另外,有学者指出,局麻药可通过线粒体释放细胞色素 c 和 ROS,与 caspase-9 和 caspase-3 共同作用导致神经细胞凋亡^[7];Zheng 等^[8]发现了一种不依赖于 caspase 的凋亡 parthanatos 参与了罗哌卡因导致的 SH-SY5Y 细胞损伤,并伴有多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 (PARP-1) 和凋亡诱导因子 (AIF) 的上调,以及 NAD^+ 的消耗。除此之外,T 型钙通道 Cav3.3、PI3K-Akt、p38 MAPK、ERK^[7,9] 等也参与了局麻药的神经毒性机制。

虽然本实验尽量模仿临床用药情况,但还有许多局限性。本实验仅限于 PC12 细胞的体外实验,仅考虑罗哌卡因这一独立因素对 PC12 细胞的影响,但人体神经细胞所处体内环境复杂;且未阻断 Fas/FasL 途径进行验证;Fas/FasL 的上调机制也不清楚。新近研究表明,p38 MAPK 抑制剂 SB203580 可显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞

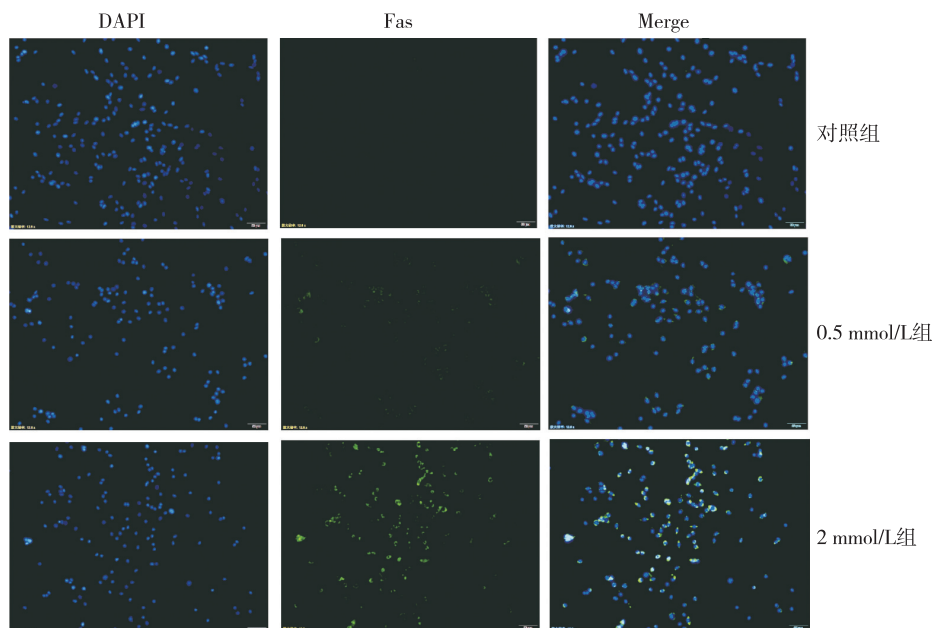


图4 免疫荧光检测不同浓度罗哌卡因对 Fas 蛋白表达的影响 (×200)

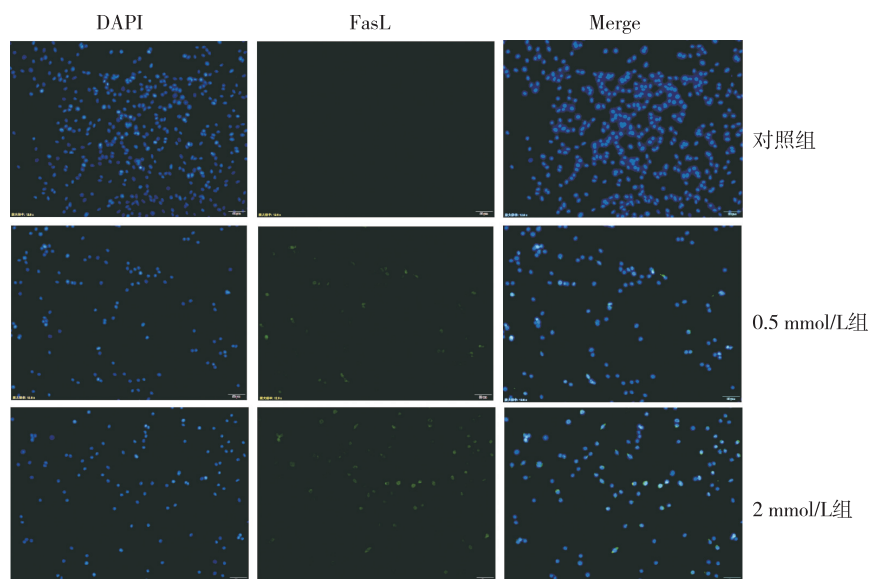
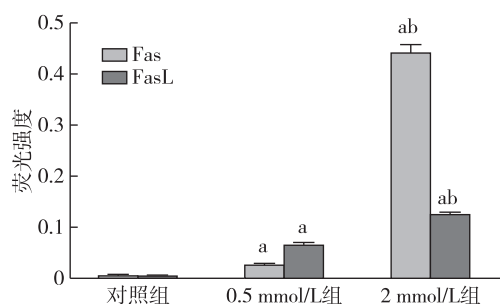


图 5 免疫荧光检测不同浓度罗哌卡因对 FasL 蛋白表达的影响 (×200)



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 0.5 mmol/L 组比较,^b $P < 0.05$

图 6 三组 Fas/FasL 荧光强度的比较

Fas/FasL 的表达,说明 p38 MAPK 可能是上调 Fas/FasL 表达的重要信号分子^[10]。那么,罗哌卡因引起的细胞凋亡和 Fas/FasL 表达增加是否受 p38 MAPK 调控? 下一步的研究方向是在整体动物实验水平研究罗哌卡因的神经毒性是否与 Fas/FasL 途径有关,并阻断 Fas/FasL 途径进行验证;然后用 SB203580 预处理,进一步探讨罗哌卡因引起的 Fas/FasL 表达上调是否与 p38 MAPK 有关。

综上所述,本实验发现罗哌卡因可引起 PC12 细胞凋亡,其机制可能与 Fas/FasL 上调有关。这为进一步阐明局麻药的神经毒性机制提供了新的实验依据。

参 考 文 献

[1] Li M, Wan L, Mei W, et al. Update on the clinical utility and practical use of ropivacaine in Chinese patients. Drug Des

Devel Ther, 2014, 8(10): 1269-1276.

- [2] Hampl K, Steinfeldt T, Wulf H. Spinal anesthesia revisited: toxicity of new and old drugs and compounds. Curr Opin Anaesthesiol, 2014, 27(5): 549-555.
- [3] Mete M, Aydemir I, Tuglu I, et al. Neurotoxic effects of local anesthetics on the mouse neuroblastoma NB2a cell line. Biotech Histochem, 2014, 90(3): 1-7.
- [4] Yu WR, Fehlings MG. Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application. Acta Neuropathol, 2011, 122(6): 747-761.
- [5] Robins-Steele S, Nguyen DH, Fehlings MG. The delayed post-injury administration of soluble fas receptor attenuates post-traumatic neural degeneration and enhances functional recovery after traumatic cervical spinal cord injury. J Neurotrauma, 2012, 29(8): 1586-1599.
- [6] Tan Y, Wang Q, Zhao B, et al. GNB2 is a mediator of lidocaine-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells. Neurotoxicology, 2016, 54(1): 53-64.
- [7] Mark V, Hollmann MW, Stevens MF, et al. Local anesthetic-induced neurotoxicity. Int J Mol Sci, 2016, 17(3): 339.
- [8] Zheng T, Zheng CY, Zheng XC, et al. Effect of parthanatos on ropivacaine-induced damage in SH-SY5Y cells. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017, 44(5): 586-594.
- [9] Wen X, Liang H, Li H, et al. In vitro neurotoxicity by ropivacaine is reduced by silencing Cav3.3 T-type calcium subunits in neonatal rat sensory neurons. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017: 1-8.
- [10] 厉小雪, 徐水凌, 张婷婷, 等. 槲皮素诱导 MCF-7 细胞凋亡及其与 Fas/FasL 通路的相关性研究. 中国病理生理杂志, 2015, 31(8): 1437-1443.

(收稿日期:2017-08-17)