

· 实验研究 ·

不同剂量右美托咪定对大鼠海马神经元缺氧复氧损伤中线粒体分裂的影响

刘佳 郭海燕 薛欣 王鹏 孙一笑 魏明 王士雷

【摘要】 目的 探讨不同剂量的右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)在大鼠海马神经元缺氧复氧损伤中对线粒体分裂的影响。**方法** 24 h 内出生的雄性 SD 大鼠,断头分离海马区神经组织,收集获得神经元细胞进行培养,8 d 后培养的海马神经元随机分为六组:正常对照组(C 组);赋形剂组(V 组);缺氧复氧组(HR)组;缺氧复氧+右美托咪定组(D1、D2、D3)组。C 组:正常培养;V 组:不行缺氧复氧、加入赋形剂二甲基亚砷培养 6 h,浓度 0.01%;HR 组:氧糖剥夺法缺氧 6 h,复氧 12 h 建立缺氧复氧损伤模型;D1、D2、D3 组,于缺氧 6 h 后分别加入右美托咪定 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 。采用激光共聚焦显微镜观察各组神经元细胞质 Ca^{2+} 荧光强度,采用 ELISA 法检测细胞钙调神经磷酸酶活性,采用透射电镜观察线粒体的超微结构,Western-blot 法检测线粒体分裂蛋白 Drp1、Fis1 的含量。**结果** 与 C 组比较,HR 组、D1 组、D2 组和 D3 组线粒体超微结构破坏加重, Ca^{2+} 荧光强度、CaN 活性明显增强,Fis1、Drp1 蛋白含量明显升高($P < 0.05$);与 HR 组比较,D1 组、D2 组和 D3 组线粒体超微结构破坏减轻, Ca^{2+} 荧光强度、CaN 活性明显减弱,Fis1、Drp1 蛋白含量明显降低($P < 0.05$);与 D1 组和 D3 组比较,D2 组线粒体结构更加完整, Ca^{2+} 荧光强度、CaN 活性明显减弱,Fis1、Drp1 蛋白含量明显降低($P < 0.05$)。C 组和 V 组各指标差异无统计学意义。**结论** 右美托咪定 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 可以减少大鼠海马神经元缺氧复氧损伤中线粒体的分裂,其中 1 $\mu\text{mol/L}$ 是最佳的保护浓度,其机制可能是与其抑制钙超载有关。

【关键词】 右美托咪定;线粒体分裂;海马神经元;缺氧复氧损伤

Effect of different doses of dexmedetomidine on mitochondrial fission in a rat hippocampal neuron model of hypoxia/reoxygenation injury LIU Jia, GUO Haiyan, XUE Xin, WANG Peng, SUN Yixiao, WEI Ming, WANG Shilei. Department of Anesthesiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266400, China

Corresponding author: WANG Shilei, Email: wshlei@aliyun.com

【Abstract】 Objective To demonstrate the effect of different doses of dexmedetomidine (Dex) on mitochondrial fission in a rat hippocampal neuron model of hypoxia/reoxygenation injury. **Methods** Sprague-Dawley rats were sacrificed in the hippocampus of the hippocampus. The neurons of the hippocampal neurons were collected and cultured on the 8th day. After 8d cultivation, the primary hippocampal neurons were randomly divided into six groups: control group (group C) which was cultured in normal group; vehicle group (group V) which was not subjected to anoxia and reoxygenation.; group HR was deprived oxygen for 6 hours, reoxygenated for 12 hours to establish hypoxia-reoxygenation injury model; HR + Dex treatment groups was further divided into D1, D2 and D3 groups who were respectively given Dex 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ during oxygen-glucose deprivation and reperfusion period. Fluorescence intensity of Ca^{2+} (using a laser scanning confocal microscope), CaN enzymatic activities (by ELISA), expression of Drp1, Fis1, (by western blot) were measured. **Results** Compared with group C, mitochondrial ultrastructure damage in group HR, group D1, group D2 and group D3 were aggravated, Ca^{2+} fluorescence intensity and CaN activity were significantly increased, and Fis1 and Drp1 protein content were significantly increased ($P < 0.05$); Compared with HR group, the mitochondrial ultrastructural damage of group D1, group D2 and group D3 was lessened, Ca^{2+} fluorescence intensity and CaN activity were significantly attenuated, and Fis1 and Drp1 protein content were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group D1 and group D3, the mitochondrial ultrastructural of group D2 was more intact, Ca^{2+} fluorescence intensity, CaN

DOI:10.12089/jca.2018.07.020

基金项目:国家自然科学基金(81771415)

作者单位:266400 青岛市,青岛大学附属医院麻醉科

通信作者:王士雷,Email:wshlei@aliyun.com

activity were significantly decreased, and Fis1, Drp1 protein content was significantly decreased ($P < 0.05$). There were no statistically significant differences between the group C and group V.

Conclusion Dex 0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$ can reduce mitochondrial fission during hypoxia-reoxygenation injury in rat hippocampal neurons, and 1 $\mu\text{mol/L}$ is the best protective concentration. Its mechanism may be related to its inhibition of calcium overload.

【Key words】 Ddexmedetomidine; Mitochondrial fission; Hippocampal neurons; Hypoxia/reoxygenation injury

既往研究显示,右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)可以通过抗凋亡途径减轻肠、心肌、肾、肺、脑和肝中的缺血-再灌注(Ischemia reperfusion, IR)损伤^[1-3],但是右美托咪定在线粒体层面减轻脑损伤的作用机制研究比较少,本实验通过体外大鼠海马神经元氧糖剥夺(OGD)和复氧处理来模拟脑 IR 损伤模型^[4-5],目的就是为了探讨右美托咪定能否调节大鼠海马神经元缺氧复氧损伤中线粒体的分裂,也为研究药物防治脑 IR 提供新的思路。

材料与方法

实验方法与分组 青岛市药检所动物中心所提供 24 h 内出生的雄性 SD 大鼠,根据文献^[6]的方法碘伏浸泡乳鼠 1~2 min,然后酒精浸泡 3 min,经过消毒后断头处死,小心取出大脑海马组织,将其放入 3~5 ml 含有 10% 血清的 DMEM-F12 培养基的培养皿中。移除培养基,然后加入 2~3 ml 的 0.25% 的胰酶,用眼科剪在胰酶消化液中剪碎海马组织,之后将海马组织块放入 25 cm^2 细胞培养瓶中,待胰酶消化 20~25 min 后,海马组织块逐渐变小、之后逐渐的成为棉絮状,如果絮状物在吸管吹打后消失,说明基本消化完全,此时需要加入 DMEM-F12 培养基来终止消化。收集用经 200 目细胞网筛过滤后的悬液,把未消化的组织块去除,再将 1 000 r/min 离心 5 min 的细胞滤过液弃上清,加入含 10% 血清 DMEM-F12 种植液于细胞沉淀中,将吹打细胞最终变成悬液。将细胞以 $7 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于提前 1 d 用多聚赖氨酸包被的细胞培养瓶和培养板中,放入 37℃, 95% O_2 , 5% CO_2 , 相对湿度 100% 的细胞培养箱中进行培养。24 h 之后用含 2% B27、1% 谷氨酰胺、1% 丙酮酸钠的 Neurabasal-A 培养液替换细胞种植液,在培养过程中,注意每隔 3 d 更换一次细胞种植液,更换时培养液更换一半保留一半。将原代培养的海马神经元细胞培养至第 8 天,神经元已经基本上发育成熟,对缺氧造成的损害敏感。将神经元细胞随机分为六组:正常对照组(C 组);赋形剂组(V 组);缺氧复氧组(HR 组);缺氧复氧+右美托咪定

(D1、D2、D3 组)。

建立细胞缺氧-复氧模型 当神经元细胞孵育至第 8 天;模拟缺氧状态调节培养箱的温度和气体条件,然后除去 Neurabasal-A 培养液,用 0.01 mol/L PBS 冲洗两遍后添加无糖 Earle's 液,6 h 后恢复有氧状态,继续培养 12 h,完成 OGD 模型。C 组正常培养,不行缺氧复氧;V 组不行缺氧复氧,加入赋形剂二甲基亚砷培养 6 h,终浓度 0.01%;HR 组 Neurabasal-A 培养液换成无糖 Earle's 平衡盐溶液,采用氧糖剥夺法缺氧 6 h,复氧 12 h 建立大鼠海马神经元 OGD 模型;D1、D2、D3 组在缺氧 6 h 时分别加入 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 右美托咪定(批号:15031442),然后继续复氧 12 h。

检测线粒体结构 将培养瓶内的培养基吸净, PBS 冲洗 2 遍后加入 1 ml 的 PBS,用细胞刮沿瓶壁轻轻将细胞刮下,用吸管将含有细胞的液体转移至离心管,1 000 r/min,离心 10 min,吸净上清液,加入 5 ml 的浓度为 2.5% 的戊二醛固定, PBS 洗 2 次,每次 10 min,然后用浓度为 1% 四氧化锇 4℃ 下固定 30 min; PBS 冲洗 3 次,每次 10 min; 2% 醋酸铀水溶液染色 30 min; 采用乙醇梯度脱水法,吸去脱水剂,加入 3 ml 的纯丙酮-EPON812 包埋剂, 37℃ 烘箱内过夜,然后依次 45℃ 烘箱内烘烤 12 h, 60℃ 烘箱内烘烤 24 h,使包埋块固化,将包埋块制作 1 μm 半薄切片,苏木素-伊红染色后超薄切片机制作 50 nm 左右的超薄切片,醋酸双氧铀两面分别染色;用透射电镜观察线粒体超微结构。

检测 Ca^{2+} 荧光强度 分组处理完毕后,吸除 Neurabasal-A 培养液,并将细胞用 Hank's 液冲洗 3 遍;每个孔中间加入 Fluo3-AM (5 $\mu\text{mol/L}$) 与 Pluronic F127 (0.05% W/V) 工作液 100 μl ,避光, 37℃ 孵育 45 min;将 Fluo3-AM 工作液移除,并用 Hank's 液再次冲洗细胞 3 次之后,于每孔中加入 Hank's 液 100 μl ,继续避光, 37℃ 孵育 30 min。孵育完毕之后,移除 Hank's 液, 4% 多聚甲醛固定之后,将细胞爬片盖到滴有 10 μl 甘油的载玻片,并用指甲油封片。在激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm 下,用激光共聚焦显微镜的油镜,观察

Ca^{2+} 荧光强度。结果图片用 Image J 软件进行分析, 取各组 Ca^{2+} 荧光的平均值进行分析。

检测 CaN 活性 分组进行缺氧复氧及右美托咪定干预之后, 移除培养液, PBS 冲洗 3 遍之后, 每个培养瓶内加入 1 ml PBS, 用细胞刮刮取神经元细胞, 收集细胞悬液并离心得到神经元, 于冰上裂解细胞, 提取细胞蛋白质之后, 并用 BCA 法检各组蛋白质浓度。根据 CaN detection kit 试剂盒说明测定各组蛋白中钙调神经磷酸酶活性, 最终用酶标仪测得的吸光度表示酶活性的大小, 结构用均值表示。

测定 Drp1、Fis1 蛋白含量 根据蛋白质分子量, 分别配制 8% 及 15% 的分离胶及浓缩胶, 加入彩色预染蛋白质 marker 3 μl , 并根据所测蛋白质浓度, 每组加入 20 μg 蛋白质样品, 80V 电泳 30 min 左右, 将电压调为 120V 继续电泳 900 min。PVDF 膜甲醇浸泡之后, 覆盖蛋白质条带进行转膜 90 min, 结束后将 PVDF 膜标记正反面, 加入用 5% 脱脂奶粉(PBS 溶解)溶液配制的兔抗鼠单克隆一抗 Drp1(1:400)、小鼠抗大鼠单克隆一抗 Fis1(1:1000), PVDF 膜蛋白质面朝上, 放于 4℃ 冰箱孵育过夜。回收一抗之后, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 分别加入山羊抗兔、山羊抗鼠 IgG 二抗(1:5000)于摇床之上孵育 1.5 h 回收二抗, TBST 洗膜 4 次, 每次 5 min, 上机显影。使用 Image Pro 软件分析结果。

统计分析 采用 SPSS 18.0 软件进行分析, 正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 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

线粒体的超微结构 C 组和 V 组线粒体结构完整、嵴结构清晰。HR 组线粒体肿胀、嵴结构连续性遭到破坏且模糊。与 HR 组比较, D1 组、D2 组和 D3 组线粒体损伤减轻, D2 组线粒体结构更加完整(图 1)。

Ca^{2+} 荧光强度 HR 组 Ca^{2+} 荧光强度明显强于 C 组($P < 0.05$)。D1、D2 和 D3 组 Ca^{2+} 荧光强度明显强于 C 组、弱于 HR 组, 且 D2 组明显弱于 D1 和 D3 组($P < 0.05$)。C 组和 V 组 Ca^{2+} 荧光强度差异无统计学意义(图 2、3)。

CaN 活性 HR 组 CaN 活性明显强于 C 组($P < 0.05$)。D1、D2、D3 组 CaN 活性明显强于 C 组、弱于 HR 组, 且 D2 组的 CaN 活性明显弱于 D1 和 D3 组($P < 0.05$)。C 组和 V 组 CaN 活性差异无统计学意义(图 4)。

线粒体分裂相关蛋白 Fis1、Drp1 含量 HR 组 Fis1 蛋白含量明显高于 C 组($P < 0.05$)。D1、D2 和 D3 组 Fis1 蛋白含量明显高于 C 组、低于 HR 组, 且 D2 组明显低于 D1 和 D3 组($P < 0.05$)。C 组和 V 组 Fis1 蛋白含量差异无统计学意义(图 5)。

HR 组 Drp1 蛋白含量明显高于 C 组($P < 0.05$)。D1、D2 和 D3 组 Drp1 蛋白含量明显高于 C 组、低于 HR 组, 且 D2 组明显低于 D1 和 D3 组($P < 0.05$)。C 组和 V 组 Drp1 蛋白含量差异无统计学意义(图 6)。

讨 论

参照文献[7-8]结合预实验结果, 本研究选择

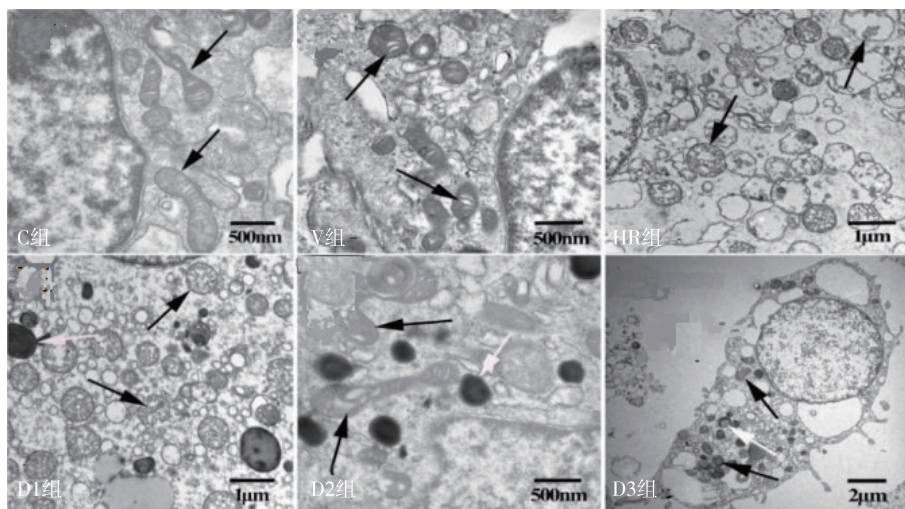
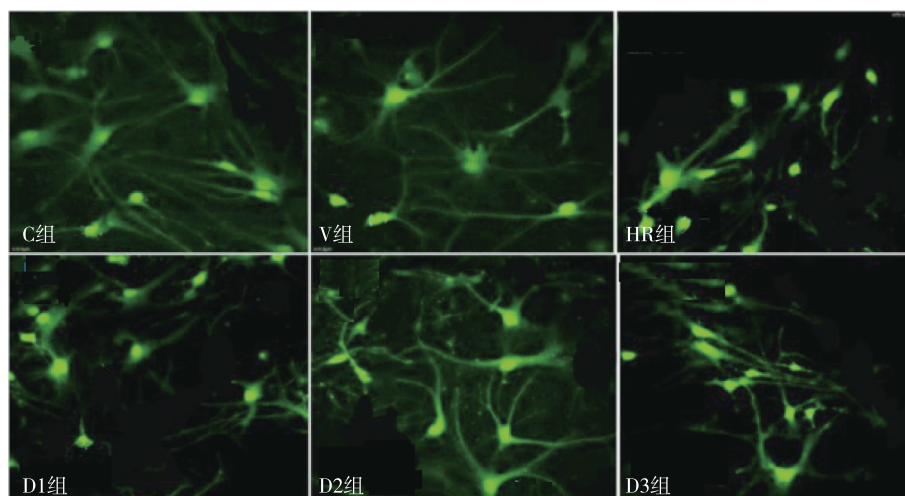
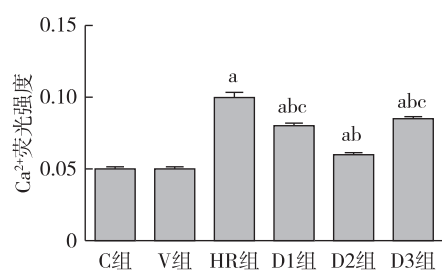
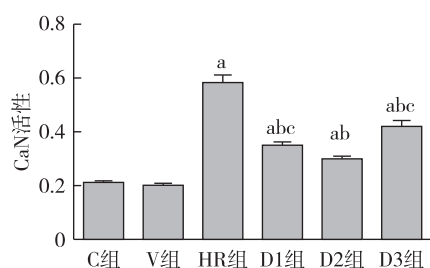


图 1 六组神经元细胞线粒体超微结构的比较($\times 400$ 倍)

图 2 六组神经元细胞 Ca^{2+} 荧光强度的比较 ($\times 400$)

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 HR 组比较,^b $P < 0.05$;与 D2 组比较,^c $P < 0.05$

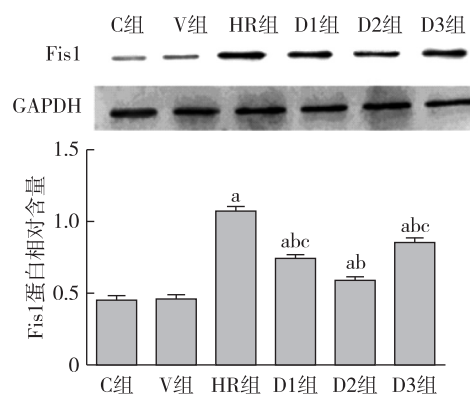
图 3 六组神经元细胞 Ca^{2+} 荧光强度的比较

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 HR 组比较,^b $P < 0.05$;与 D2 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 六组神经元细胞 CaN 活性的比较

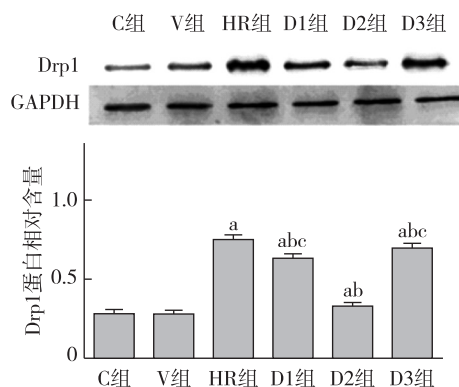
24 h 内出生的雄性 SD 大鼠海马神经元作为研究对象,选用 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 不同右美托咪定浓度进行处理^[9],采用氧糖剥夺法缺氧 6 h,复氧 12 h 建立大鼠海马神经元 OGD 模型。

脑 IR 损伤与细胞内的钙超载有着密切的联系^[10],钙超载的机制和细胞内凋亡是集中研究的一个领域,细胞内钙离子的超载,又会引起线粒体



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 HR 组比较,^b $P < 0.05$;与 D2 组比较,^c $P < 0.05$

图 5 六组神经元细胞线粒体分裂相关蛋白 Fis1 含量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 HR 组比较,^b $P < 0.05$;与 D2 组比较,^c $P < 0.05$

图 6 六组神经元细胞线粒体分裂相关蛋白 Drp1 含量的比较

的分裂,进一步加重细胞的凋亡。线粒体分裂蛋白 Drp1 和 Fis1 在线粒体的分裂和融合当中起到重要作用^[11]。Drp1 在线粒体表面组装和寡聚化以诱导分裂,而 Fis1 的作用是通过结合并募集 Drp1 到线粒体表面促进线粒体的分裂,它可以调节线粒体的数量和位置、细胞能量的变化和及时处置受损的线粒体。有研究表明线粒体的分裂过程中,钙信号可以对线粒体分裂相关蛋白 Drp1 的磷酸化与去磷酸化产生影响^[12-13],钙离子进入细胞后,激活 CaN,后者引起 Drp1 去磷酸化,其位点主要为丝氨酸 637 或丝氨酸 656 位点,去磷酸化的 Drp1 在线粒体表面定位聚集,加速线粒体分裂^[14];因此如果减少线粒体摄取钙离子的量,就可以降低线粒体的分裂能力,减少分裂线粒体的分裂次数。

本实验分别选用 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的右美托咪定,继而通过 BCA、Western blot 等方法观察 OGD 诱导神经元细胞的线粒体分裂的情况,通过透射电镜观察线粒体的超微结构。实验结果显示,在大鼠海马神经元 OGD 模型中,各种浓度的右美托咪定都可以降低细胞质 Ca^{2+} 浓度,减少线粒体分裂蛋白 Drp1、Fis1 的表达,减少线粒体超微结构的破坏,其中 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的右美托咪定对线粒体的保护作用更为明显,结果与已经证明的 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的右美托咪定在体外缺血模型可以作为最佳保护浓度^[15]相吻合。其机制可能是右美托咪定能降低钙超载从而抑制钙调神经磷酸酶的活性,减少其对 Drp1-ser637 的磷酸化,进而抑制 Drp1 的转位,减少与线粒体外膜蛋白 Fis1 的结合有关系;此外,右美托咪定还可以抑制 Drp1-ser637 与 Fis1 的表达,减少它们在线粒体外膜的共定位结合,从而抑制线粒体分裂。

综上所述,右美托咪定 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 可以减轻大鼠海马神经元缺氧复氧损伤中的线粒体分裂,其中 1 $\mu\text{mol/L}$ 能够提供最佳的浓度。

参 考 文 献

- [1] Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 2008, 55(3): 310-318.
- [2] Chen Z, Venkat P, Seyfried D, et al. Brain-heart interaction: Cardiac complications after stroke. *Circ Res*, 2017, 121(4): 451-468.
- [3] Wong ES, Man RY, Vanhoutte PM, et al. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different $\{\alpha\}$ 2-adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 335(3): 659-664.
- [4] 康恺, 康芳, 沈玉君 等. 不同浓度右美托咪定对糖氧剥夺/再灌注诱导神经细胞凋亡的影响. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(8): 793-796.
- [5] 扈俊华, 梁羽冰, 覃怡, 等. 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.
- [6] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, Mantz J. Characterization of the postconditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation. *Anesthesiology*, 2010, 112(2): 373-383.
- [7] Otera H, Ishihara N, Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(5): 1256-1268.
- [8] Peng K, Qiu Y, Li J, et al. Dexmedetomidine attenuates hypoxia/reoxygenation injury in primary neonatal rat cardiomyocytes. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 689-695.
- [9] Liang N, Wang P, Wang S, et al. Role of mitochondrial calcium uniporter in regulating mitochondrial fission in the cerebral cortexes of living rats. *J Neural Transm*, 2014, 121(6): 593-600.
- [10] Rodríguez-González R, Sobrino T, Veiga S, et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine conditioning strategies: evidences from an in vitro model of cerebral ischemia. *Life Sci*, 2016, 144: 162-169.
- [11] Park JW, Chung HW, Lee EJ, et al. α 2-Adrenergic agonists including xylazine and dexmedetomidine inhibit norepinephrine transporter function in SK-N-SH cells. *Neurosci Lett*, 2013, 541: 184-189.
- [12] Losón OC, Song Z, Chen H, et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(5): 659-667.
- [13] Manczak M, Reddy PH. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(11): 2538-2547.
- [14] Otera H, Ishihara N, Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(5): 1256-1268.
- [15] Engelhard K, Werner C, Kaspar S, et al. Effect of the α 2-agonist dexmedetomidine on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology*, 2002, 96(2): 450-457.

(收稿日期: 2017-10-26)