

· 实验研究 ·

脂肪乳剂减轻布比卡因抑制原代培养海马神经元活力

王芳 李军 刘春宏 聂湜 陈学新

【摘要】 目的 研究脂肪乳剂对布比卡因致原代培养海马神经元神经毒性的影响。**方法** 选择原代培养第 8 天的海马神经元,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法计算布比卡因对海马神经元的半抑制浓度(IC_{50}),用接近 IC_{50} 的 3 个浓度分别作用 12 h、24 h 和 36 h,MTT 法检测神经元活力,观察布比卡因对海马神经元的神经毒性作用,得出最佳布比卡因浓度和作用时间进行后续实验。将原代海马神经元细胞分为四组($n=3$):空白对照组(C 组)不做任何处理;布比卡因组(B 组)加入布比卡因;脂肪乳剂组(L 组)加入 1% 脂肪乳剂;布比卡因+脂肪乳剂组(BL 组)加入布比卡因和 1% 脂肪乳剂。各组均处理一定时间后光学显微镜观察海马神经元生长状态,检测各组神经元活力,免疫荧光染色法检测裂解半胱天冬酶-3(cleaved caspase-3)的表达并统计 cleaved caspase-3 阳性神经元占神经元总数的比例。**结果** 布比卡因的 IC_{50} 为 0.033 62%,摩尔浓度为 980.4 μ M。选择布比卡因浓度为 1 mmol/L 和作用时间为 24 h 进行后续实验。与 C 组比较,B 组海马神经元细胞活力明显减弱($P<0.01$)。与 B 组比较,L 组和 BL 组海马神经元细胞活力明显增强($P<0.01$)。与 C 组比较,B 组和 BL 组 cleaved caspase-3 阳性率明显升高($P<0.01$),与 B 组比较,BL 组神经元 cleaved caspase-3 阳性率明显降低($P<0.01$),C 组和 L 组 cleaved caspase-3 阳性率差异无统计学意义。**结论** 布比卡因诱发海马神经元神经毒性呈浓度剂量和时间依赖性,脂肪乳剂减轻布比卡因的神经毒性可能与增加海马神经元的细胞活力有关。

【关键词】 脂肪乳剂;布比卡因;神经元活力;凋亡

Lipid emulsion reduces the inhibition of the hippocampus neuronal activity induced by bupivacaine

WANG Fang, LI Jun, LIU Chunhong, NIE Hao, CHEN Xuexin. Department of Anesthesiology, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750011, China

Corresponding author: CHEN Xuexin, Email: chenxuexin2637@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of lipid emulsion on bupivacaine induced neurotoxicity in primary cultured hippocampal neurons. **Methods** The eighth day primary cultured hippocampal neurons were used to calculate the half inhibitory concentration (IC_{50}) of bupivacaine by the cytotoxicity using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Hippocampal neurons were treated with different concentrations close to IC_{50} for 12 h, 24 h and 36 h detect the neuronal vitality using MTT to observe the neurotoxicity of bupivacaine on hippocampal neurons, then the optimal concentration and treated time of bupivacaine were obtained and used to the subsequent experiments. The primary cultured hippocampal neurons were divided into control group (group C), bupivacaine group (group B), lipid emulsion group (group L), bupivacaine+lipid emulsion group (group BL). Group C without any treatment, group B was treated with bupivacaine, group L was treated with 1% lipid emulsion, group BL was treated with bupivacaine and 1% lipid emulsion. After treatment for a certain period of time, the growth state of hippocampal neurons was observed under light microscopy, the neuronal vitality was detected by MTT and the expression of cleaved caspase-3 was detected using immunofluorescence staining and then the rate of cleaved caspase-3 positive neurons in the total number of neurons was quantified. **Results** Bupivacaine had an IC_{50} of 0.033 62% and a molar concentration of 980.4 μ M. The subsequent experiments were performed with a bupivacaine concentration of 1 mmol/L and a duration of 24 h. Compared with group C, the viability of hippocampal neurons in group B was significantly weaker ($P<0.01$). Compared with group B, the viability of hippocampal

DOI:10.12089/jca.2018.11.017

基金项目:国家自然科学基金(81560305)

作者单位:750011 银川市,宁夏回族自治区人民医院麻醉科(王芳);宁夏医科大学总医院麻醉科(李军);宁夏医科大学临床医学院麻醉学专业(刘春宏、聂湜);宁夏医科大学总医院肿瘤医院麻醉科(陈学新)

通信作者:陈学新,Email:chenxuexin2637@163.com

neurons in group L and group BL was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with group C, the positive rate of cleaved caspase-3 in group B and BL was significantly higher ($P < 0.01$). Compared with group B, the positive rate of cleaved caspase-3 in group BL was significantly lower ($P < 0.01$). There was no significant difference in the positive rate of cleaved caspase-3 between group L and group C. **Conclusion** Bupivacaine induced neurotoxicity in hippocampal neurons in a concentration- and time-dependent manner. The lipid emulsion can reduce the neurotoxicity of bupivacaine, which may be related to the increase of cell viability of hippocampal neurons.

【Key words】 Lipid emulsion; Bupivacaine; Neuronal viability; Apoptosis

布比卡因(bupivacaine)是临床麻醉与镇痛治疗中常用的酰胺类长效局麻药之一,如若误入血管或用药剂量过大则可引起惊厥、心脏骤停等严重的局麻药中毒症状^[1]。局麻药中枢神经系统毒性惊厥的发生、发展与大脑海马密切相关^[2-3],脂肪乳剂(lipid emulsion)救治布比卡因所致的中枢神经系统毒性效果确切^[4-5],但机制仍不清楚。原代海马神经元可以较好的反映机体神经系统的情况,然而布比卡因对原代海马神经元的细胞活性是否有影响,脂肪乳剂是否通过增加海马神经元的细胞活性来救治布比卡因中毒现不清楚。本实验主要研究脂肪乳剂对布比卡因致原代大鼠海马神经元神经毒性的影响。

材料与方法

实验动物与处理 新生 24 h 内的 SD 大鼠乳鼠酒精浸泡消毒后,分离消化海马细胞,用 DMEM/F12+10% FBS 重悬后计数,分别接种于 96 孔板和多聚赖氨酸包被的 24 孔板细胞爬片中,培养 4 h 后,接种液清洗 1 次,更换为 Neurobasal-A+2% B27 无血清培养基,第 2 天半量换液,48 h 后更换含阿糖胞苷培养液(神经元完全培养基加终浓度 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 阿糖胞苷),此后每隔 2~3 d 换培养液,每次半量换液,培养第 8 天备用。

布比卡因 IC_{50} 测定 原代培养的 SD 大鼠海马神经元,加不同浓度(布比卡因原液浓度为 0.75%,最高加药浓度为 0.25%,3 倍稀释,共设 9 个浓度)的布比卡因作用 24 h 后测定神经元活力,计算布比卡因的 IC_{50} 。再选择与布比卡因的 IC_{50} 接近的 3 个浓度,分别作用 12 h、24 h 和 36 h,检测海马神经元活力,选用最佳布比卡因浓度与作用时间继续后续实验。

MTT 法神经元活力检测 将细胞种于 96 孔板的海马神经元分组处理后,每孔加 25 μl MTT(四甲基偶氮唑蓝),使其终浓度为 1 mg/ml ,混匀,继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h,每孔加 100 μl 溶解液(25% SDS+50% DMF),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;于酶标仪在

570 nm 波长处读取各孔的吸光度值,实验重复 3 次。

实验分组与处理 将海马神经元分为空白对照组(C 组),布比卡因组(B 组),脂肪乳剂组(L 组),脂肪乳剂处理组(BL 组)。C 组不做任何处理,B 组给予布比卡因,L 组给予 1% 脂肪乳剂,BL 组给予布比卡因和 1% 脂肪乳剂,各组均处理一定时间,光学显微镜观察各组海马神经元生长状态,并检测其细胞活性。

裂解半胱天冬酶-3 阳性率检测 免疫荧光染色法检测裂解半胱天冬酶-3(cleaved caspase-3)的表达,小心吸净 24 孔板内的培养基,加 PBS 轻轻晃动清洗 3 次,用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 洗去剩余的固定液,加入 0.5% Triton X-100 枸橼酸盐缓冲液室温下作用 20 min,PBS 清洗,5% 正常山羊血清室温封闭 1 h 后吸净,加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,吸出一抗,PBS 清洗,荧光二抗室温孵育 2 h,注意避光,PBS 清洗,DAPI 室温避光复染 10 min,PBS 清洗,各步骤间 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。取出 24 孔板爬片吸干多余液体,滴加抗荧光淬封片剂封片,荧光显微镜下拍照计数。计算 cleaved caspase-3 阳性神经元细胞数占神经元细胞总数的比例,即 cleaved caspase-3 阳性率。

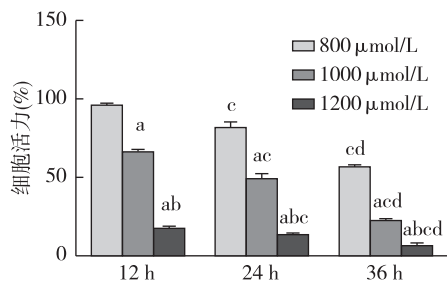
统计分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

布比卡因对原代海马神经元活力的抑制作用 原代培养的 SD 大鼠海马神经元,加不同稀释浓度的布比卡因作用 24 h 后 MTT 法测定神经元活力,计算布比卡因的 IC_{50} 为 0.033 62%,换算成摩尔浓度为 980.4 μM 。

选择与布比卡因的 IC_{50} 接近的三个浓度 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、1 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 1 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$,分别作用 12 h、24 h 和 36 h,MTT 法检测神经元活力。与浓

度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 比较,不同作用时间浓度为 1 000 和 1 200 $\mu\text{mol/L}$ 神经元活力明显减弱 ($P < 0.05$);与浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 比较,不同作用时间浓度为 1 200 $\mu\text{mol/L}$ 神经元活力明显减弱 ($P < 0.05$);与作用时间 12 h 比较,不同浓度作用时间 24 和 36 h 神经元活力明显减弱 ($P < 0.05$);与 24 h 比较,不同浓度作用时间 36 h 神经元活力明显减弱 ($P < 0.05$)。当布比卡因浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 即 1 mmol/L,作用 24 h 时神经元活力约减弱 50% (图 1),本实验选择此浓度和作用时间进行后续实验。



注:与 800 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $^a P < 0.05$; 与 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $^b P < 0.05$; 与 12 h 比较, $^c P < 0.05$; 与 24 h 比较, $^d P < 0.05$

图 1 不同浓度和作用时间布比卡因对原代海马神经元活力影响的比较 ($\bar{x} \pm s$)

海马神经元生长情况 C组与L组海马神经元胞体丰满,立体感强,突起粗且长且相互交织成密集的网络,B组海马神经元胞体皱缩,突起细短,甚至无突起,神经元间联系明显减少,无密集网络形成,BL组海马神经元数量胞体较丰满,突起存在,可与周围神经元突起交互形成网络(图2)。

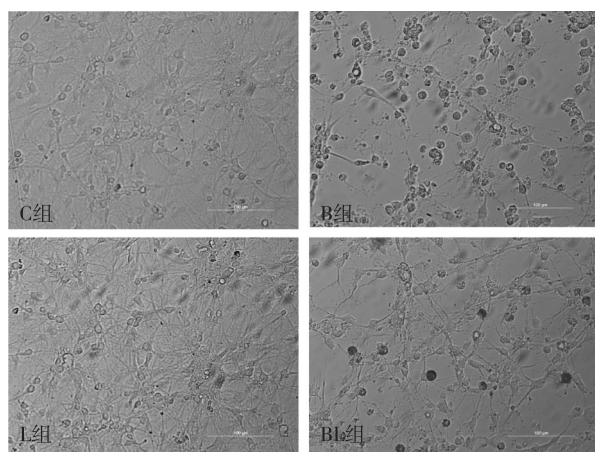
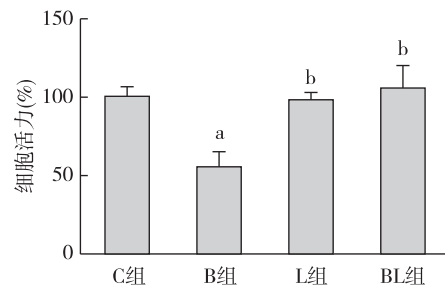


图 2 四组海马神经元的生长状态的光镜图 ($\times 200$)

海马神经元的细胞活力检测 与C组比较,B

组海马神经元细胞活力明显减弱 ($P < 0.01$)。与B组比较,L组和BL组海马神经元细胞活力明显增强 ($P < 0.01$) (图3)。



注:与C组比较, $^a P < 0.01$; 与B组比较, $^b P < 0.01$

图 3 四组海马神经元细胞活力的比较

海马神经元 cleaved caspase-3 阳性率检测 与C组比较,B组和BL组 cleaved caspase-3 阳性率明显升高 ($P < 0.01$)。与B组比较,BL组神经元 cleaved caspase-3 阳性率明显降低 ($P < 0.01$)。C组和L组 cleaved caspase-3 阳性率差异无统计学意义(表1)。

表 1 四组海马神经元 cleaved-caspase 3 阳性率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	cleaved-caspase 3 阳性率(%)
C组	3	10.08 $\pm$ 1.52
B组	3	48.52 $\pm$ 3.72 ^a
L组	3	11.56 $\pm$ 2.47 ^b
BL组	3	23.15 $\pm$ 1.44 ^{ab}

注:与C组比较, $^a P < 0.01$; 与B组比较, $^b P < 0.01$

讨 论

脂肪乳剂用于救治布比卡因局麻药中毒已被人们普遍接受^[6-7],以往研究多注重于布比卡因所致的心脏毒性^[8-11],对其中枢神经系统毒性机制的研究较少,而中枢神经系统毒性较其心脏毒性发生更早^[1],因此对于脂肪乳救治布比卡因所致中枢神经系统毒性的研究尤为重要。

原代培养的神经元目前广泛应用于神经系统疾病的研究,本实验采用原代海马神经元作为实验对象来研究脂肪乳剂救治布比卡因所致中枢神经系统毒性的作用,排除了机体自身代谢及调节等因素的干扰,从而更加直观的验证脂肪乳剂对布比卡因致中枢神经毒性时对海马神经元的保护作用。

已有研究表明,布比卡因能够诱导神经细胞凋亡^[12-13],所有局麻药的神经毒性都呈浓度剂量和时间依赖性^[14]。本实验结果显示布比卡因可以抑制原代海马神经元的细胞活力,其 IC_{50} 为 $980.4 \mu\text{mol/L}$,根据 IC_{50} 选择不同布比卡因浓度和作用时间处理原代海马神经元,检测神经元活力,从实验结果可以看出布比卡因作用相同时间,其浓度越高,海马神经元活力越弱;布比卡因浓度相同时,其作用时间越长,海马神经元活力越弱。即布比卡因浓度越大,作用时间越长,原代海马神经元细胞活力越弱,布比卡因毒性越大。其中 $1\ 000 \mu\text{mol/L}$ 即 1 mmol/L 布比卡因作用 24 h 可以抑制 50% 海马神经元细胞的活性,因此,结合以往脂肪乳剂救治布比卡因毒性的研究^[10-11],选择 1 mmol/L 布比卡因和 1% 脂肪乳剂作用 24 h 来研究脂肪乳剂对布比卡因致海马神经元神经毒性的影响。

光学显微镜下可以观察到布比卡因抑制海马神经元突起的生长,海马神经元间无密集网络形成,这也显示局麻药可以抑制突触轴突生长^[15],减少海马神经元间的联系,而布比卡因加脂肪乳剂作用的海马神经元的突起明显增多,可与周围海马神经元突起相互交织成网,海马神经元间联系增多,显示脂肪乳剂可以减轻布比卡因的神经毒性作用,促进细胞生长,增加海马神经元间的联系。神经元活力检测结果显示布比卡因明显抑制海马神经元的细胞活力,而给予脂肪乳剂则可以明显增强其神经元活力,此结果与光学显微镜观察结果一致。细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象,在维持体内细胞数量动态平衡中起重要作用,而细胞凋亡过程的紊乱可能与许多疾病的发生有直接或间接的关系。Cleaved caspase-3 是一种细胞凋亡标记物^[16],本实验用 cleaved caspase-3 标记呈阳性者代表凋亡神经元,本实验中 cleaved caspase-3 阳性率的比较结果显示,布比卡因使原代海马神经元凋亡增加,而脂肪乳剂则可以减少其凋亡。本实验结果显示脂肪乳剂可以减轻布比卡因对海马神经元的毒性作用,为临床上脂肪乳剂救治布比卡因所致中枢神经中毒提供依据。

综上所述,布比卡因诱发海马神经元神经毒性呈浓度剂量和时间依赖性,脂肪乳剂可促进海马神经元的生长,增加海马神经元细胞活力,从而减轻其神经毒性作用。

参 考 文 献

[1] Wolfe JW, Butterworth JF. Local anesthetic systemic

toxicity: update on mechanisms and treatment. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2011, 24(5): 561-566.

- [2] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, et al. The effects of lidocaine and bupivacaine on protein expression of cleaved caspase 3 and tyrosine phosphorylation in the rat hippocampal slice. *Anesth Analg*, 2007, 104(1): 119-123.
- [3] 赵元子, 李树人, 盖晓丹, 等. 罗哌卡因和布比卡因对大鼠海马神经元电压门控性钾电流的影响. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24(2): 126-129.
- [4] Oda Y, Ikeda Y. Effect of lipid emulsion on the central nervous system and cardiac toxicity of bupivacaine and levobupivacaine in awake rats. *J Anesth*, 2013, 27(4): 500-504.
- [5] Wu G, Sun B, Liu LI, et al. Lipid emulsion mitigates local anesthesia-induced central nervous system toxicity in rats. *Exp Ther Med*, 2015, 10(3): 1133-1138.
- [6] Fettiplace MR, McCabe DJ. Lipid emulsion improves survival in animal models of local anesthetic toxicity: a Meta-analysis. *Clin Toxicol (Phila)*, 2017, 55(7): 617-623.
- [7] Harvey M, Cave G. Lipid emulsion in local anesthetic toxicity. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2017, 30(5): 632-638.
- [8] Park WK, Kim HS, Kim SH, et al. Intralipid restoration of myocardial contractions following bupivacaine-induced asystole: concentration- and time-dependence in vitro. *Anesth Analg*, 2017, 125(1): 91-100.
- [9] Fettiplace MR, Kowal K, Ripper R, et al. Insulin signaling in bupivacaine-induced cardiac toxicity: sensitization during recovery and potentiation by lipid emulsion. *Anesthesiology*, 2016, 124(2): 428-442.
- [10] Yang L, Bai Z, Lv D, et al. Rescue effect of lipid emulsion on bupivacaine-induced cardiac toxicity in cardiomyocytes. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 3739-3747.
- [11] 吕丹妮, 摆志霞, 杨立斌, 等. 脂肪乳对布比卡因诱发大鼠心肌毒性时线粒体能量代谢的影响. *中华麻醉学杂志*, 2015, 35(11): 1344-1346.
- [12] 梁予洁, 吉杰梅, 刘敬臣. 神经节甘脂预处理对布比卡因诱导 N2a 神经细胞凋亡后 caspase-3 表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(7): 688-691.
- [13] Niu X, Chen J, Wang P, et al. The effects of hispidulin on bupivacaine-induced neurotoxicity: role of AMPK signaling pathway. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 241-249.
- [14] Yang S, Abrahams MS, Hurn PD, et al. Local anesthetic schwann cell toxicity is time and concentration dependent. *Reg Anesth Pain Med*, 2011, 36(5): 444-451.
- [15] Onizuka S, Shiraishi S, Tamura R, et al. Lidocaine treatment during synapse reformation periods permanently inhibits NGF-induced excitation in an identified reconstructed synapse of *lymnaea stagnalis*. *J Anesth*, 2012, 26(1): 45-53.
- [16] Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt 1): 1-9.

(收稿日期: 2018-02-13)