

· 实验研究 ·

孕酮减轻七氟醚诱导原代海马神经元损伤

林晓婉 马丽 刘贝贝 郭航 孙立 高明龙 刘永哲 马亚群 郭文治

【摘要】 目的 探究孕酮是否能够减轻七氟醚诱导的原代海马神经元损伤及其可能机制。**方法** 取新生 24 h 内的 SD 乳鼠,提取海马神经元培养至第 7 天后随机分为对照组(C 组)、七氟醚组(S 组)、孕酮+七氟醚组(P 组)和醋酸乌利司他+孕酮+七氟醚组(U 组)。C 组神经元加入溶剂二甲基亚砜(DMSO)后正常培养;S 组加入 DMSO 后行七氟醚处理;P 组加入孕酮 1 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 1 h 后行七氟醚处理;U 组加入醋酸乌利司他 1 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 1 h 后,余同 P 组。采用 CCK-8 法检测神经元细胞活力,采用 TUNEL 染色检测细胞凋亡率,采用 Western blot 法测定蛋白激酶 B(Akt)和磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)蛋白含量,在倒置相差显微镜下观察各组细胞形态改变。**结果** 与 C 组比较,S 组细胞活力明显减弱、细胞凋亡率明显升高、p-Akt 蛋白含量和 p-Akt/Akt 比值明显下降($P < 0.01$);与 S 组比较,P 组细胞活力明显增强、细胞凋亡率明显降低、p-Akt 蛋白含量和 p-Akt/Akt 比值明显升高($P < 0.01$);与 P 组比较,U 组细胞活力明显减弱、细胞凋亡率明显升高、p-Akt 蛋白含量和 p-Akt/Akt 比值明显下降($P < 0.01$)。形态学上,C 组细胞形态正常,S 组和 U 组细胞表现出凋亡形态,而 P 组细胞形态基本正常。**结论** 孕酮可通过孕酮受体上调 Akt 蛋白磷酸化水平减轻七氟醚诱导的原代海马神经元损伤。

【关键词】 孕酮;七氟醚;原代海马神经元;蛋白激酶 B

Progesterone attenuates sevoflurane-induced neuronal injury in primary hippocampal neurons LIN Xiaowan, MA Li, LIU Beibei, GUO Hang, SUN Li, GAO Minglong, LIU Yongzhe, MA Yaqun, GUO Wenzhi. Department of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: GUO Wenzhi, Email: elite2005gg@163.com

【Abstract】 Objective To explore whether progesterone can attenuate sevoflurane-induced neuronal injury in primary hippocampal neurons and its possible mechanism. **Methods** Hippocampal neurons were isolated from postnatal day 1 SD rats and were cultured in vitro for 7 d. Cells were randomly divided into four groups: control group (group C), sevoflurane group (group S), progesterone+sevoflurane group (group P) and ulipristal acetate+progesterone+ sevoflurane group (group U). The neurons in group C received no treatment but the addition of solvent dimethyl sulfoxide (DMSO). Group S was treated with sevoflurane after adding DMSO. Group P was pretreated with 1 $\mu\text{mol/L}$ of progesterone for 1 h, followed by exposure of sevoflurane. Group U was pretreated with 1 $\mu\text{mol/L}$ ulipristal acetate for 1 h before adding progesterone and exposure of sevoflurane. Then cell viability and apoptosis were respectively assessed by CCK-8 and TUNEL staining. Western blot analysis was performed to detect the expression of p-Akt and Akt. Morphological changes of cells were observed under inverted phase contrast microscopy. **Results** Compared with group C, the cell viability of group S was significantly lower, the apoptotic rate was significantly higher, and the expression of p-Akt protein and p-Akt/Akt were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with group S, the cell viability of group P was significantly higher, the apoptotic rate was significantly lower, and the expression of p-Akt protein and p-Akt/Akt were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with group P, the cell viability of group U was significantly lower, the apoptotic rate was significantly higher, and the expression of p-Akt protein and p-Akt/Akt were significantly decreased ($P < 0.01$). Cells in group C and group P had normal or basically normal morphology, while cells in group S and U manifested typical apoptosis character. **Conclusion** Progesterone can attenuate sevoflurane-induced neuronal injury in primary hippocampal neurons by binding to progesterone receptors and up-regulating the expression of p-Akt.

【Key words】 Progesterone; Sevoflurane; Primary hippocampal neurons; Protein kinase B

DOI: 10.12089/jca.2020.07.014

基金项目:国家自然科学基金(81701072);首都临床特色应用研究(Z181100001718002)

作者单位:030001 太原市,山西医科大学麻醉学院(林晓婉、刘贝贝);解放军总医院第七医学中心麻醉科(马丽、郭航、孙立、高明龙、刘永哲、马亚群、郭文治)

通信作者:郭文治,Email: elite2005gg@163.com

七氟醚是临床上最常用的吸入麻醉药之一,因其血流动力学稳定,诱导及苏醒迅速,对气道刺激小等优势而广泛应用于产科及小儿手术麻醉。然而,研究发现在母体妊娠末期及出生后最初几年是人类大脑快速发育的关键时期,易受多种因素影响,如环境刺激、应激、药物等^[1]。同时,有证据表明七氟醚对发育期大脑具有一定的神经损害作用,七氟醚的早期暴露可能影响大脑发育和认知功能^[2]。因而,寻求防治七氟醚所致神经毒性的药物及措施具有重大意义。另一方面,孕酮在多种创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)模型中表现出神经保护作用^[3-4],其非生殖相关药物作用逐渐受到关注,且既往研究^[5]表明孕酮受体广泛分布于中枢神经系统,对调节神经系统功能有重要作用,这预示着孕酮可成为一种潜在的神经保护药物。本研究探讨孕酮是否可以减轻七氟醚所致的原代海马神经元损伤,并进一步研究可能的作用机制。

材料与方法

实验材料与动物 七氟醚(批号:18071031),孕酮(批号:P0130),醋酸乌利司他(批号:S3081),二甲基亚砜(DMSO),DMEM/F12 培养液,Neurobasal 培养基,B27 添加剂,谷氨酰胺,胎牛血清,双抗,一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒,CCK-8 试剂盒,DAPI 染色液,神经元核抗原(Neun)抗体,磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)抗体,蛋白激酶 B(Akt)抗体。SPF 级雌性 SD 孕鼠购自北京斯贝福生物技术有限公司,生产许可证号为 SCXK(京)2016—0002。

细胞培养 参考文献^[6]稍作调整,取新生 24 h 内的 SD 乳鼠,分离海马组织,用终浓度为 0.125% 的胰蛋白酶在 37℃ 下消化 15 min。加入 1 ml 胎牛血清终止消化,离心弃上清,加入含 10% 胎牛血清培养液吹打过滤,收集细胞悬液种板,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后全量换液为 Neurobasal 无血清培养基,随后每 3 天半量换液。培养至第 7 天用于实验。经 Neun 染色法鉴定神经元纯度达 90% 以上进行后续实验。

七氟醚损伤模型 将培养的原代海马神经元随机分为 7 组:6 h 对照组(C1 组)、12 h 对照组(C2 组)、2% 七氟醚 6 h 组(S1 组)、4% 七氟醚 6 h 组(S2 组)、8% 七氟醚 6 h 组(S3 组)、4% 七氟醚 12 h 组(S4 组)、8% 七氟醚 12 h 组(S5 组)。参考文献^[7]进行七氟醚处理:将细胞置于密闭容器中,S1、S2、

S3 组以 95% 空气和 5% CO₂ 为载气气体通过七氟醚挥发罐分别通入 2%、4%、8% 七氟醚,共 6 h,气体流量 2 L/min,37℃;S4 组和 S5 组则分别通入 4% 和 8% 七氟醚,共 12 h,余条件同上;C1、C2 组通入 95% 空气和 5% CO₂ 分别处理 6 h 和 12 h,余条件同上。每组设 10 个复孔,采用 CCK-8 法,S1-S3 组和 S4-S5 组分别以 C1 和 C2 组细胞存活率为 100%,计算各组细胞存活率=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)]×100%。根据实验结果选择最合适的七氟醚浓度。

实验分组与处理 根据 CCK-8 结果,后续采用七氟醚干预强度为 8% 七氟醚处理细胞 12 h,处理方法同上。随后取新培养的原代海马神经元,采用随机数字表法将其分为 4 组:对照组(C 组)、七氟醚组(S 组)、孕酮+七氟醚组(P 组)、醋酸乌利司他+孕酮+七氟醚组(U 组)。其中 C 组和 S 组在相应时点加入 DMSO 后,C 组正常培养,S 组通入七氟醚处理(方法同前)。P 组加入孕酮(0.001、0.01、0.1、1 μmol/L)预处理 1 h 后行七氟醚暴露。U 组先加入醋酸乌利司他 1 μmol/L 处理 1 h,再加入孕酮 1 μmol/L 处理 1 h,最后进行七氟醚暴露。

CCK-8 法检测细胞活力 将原代海马神经元以 3×10⁴ 个/孔的密度种植于 96 孔板中培养 7 d,每组细胞设 10 个复孔,经各组处理后,更换培养基,加入 10 μl CCK-8,置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值。

TUNEL 染色法检测细胞凋亡 取经各组处理后的细胞爬片,PBS 洗 3 次各 5 min,在细胞爬片上加 100 μl 的 TUNEL 检测液,37℃ 避光孵育 60 min,PBS 洗 3 次各 5 min,加 DAPI 室温下染核 15 min,PBS 洗 3 遍,甘油封片,于荧光显微镜下观察拍摄。每组随机选 5 个视野,计算神经元凋亡率=[TUNEL 阳性细胞/细胞总数(DAPI)]×100%。

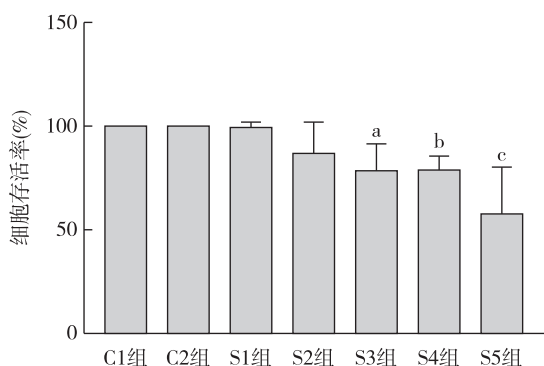
p-Akt 和 Akt 蛋白含量检测 取各组培养在 6 孔板里的细胞,PBS 洗 3 次,每孔加入 100 μl 的细胞裂解液,冰上震荡裂解 30 min,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,加入变性蛋白上样缓冲液,混匀后沸水煮 5 min。10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白质并转膜(PVDF 膜),10% 的脱脂奶粉封闭 2 h,加一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,室温下二抗摇床孵育 2 h,TBST 洗 3 次,使用 BIO-RAD XRS+Software 显影,Image Lab 图像分析软件对结果进行灰度分析。

统计分析 应用 Graphpad prism5.0 软件进行

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,组内比较采用重复测量方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

七氟醚损伤模型 与 C1 组比较, S1、S2 组细胞存活率差异无统计学意义, S3 组细胞存活率明显下降($P<0.05$)。与 C2 组比较, S4、S5 组细胞存活率明显下降($P<0.05$)。为达到更明显的实验效果,后续实验选择 S5 组处理强度即 8% 七氟醚对原代海马神经元处理 12 h, 建立神经元损伤模型(图 1)。



注:与 C1 组比较,^a $P<0.05$;与 C2 组比较,^b $P<0.05$,
^c $P<0.01$

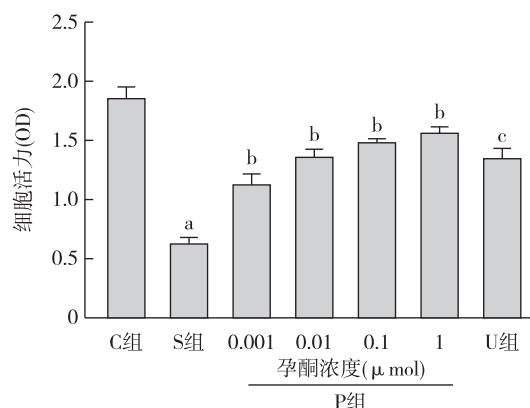
图 1 不同浓度七氟醚不同处理时间对原代海马神经元存活率的比较

CCK-8 法检测细胞活力 与 C 组比较, S 组细胞活力明显减弱($P<0.01$)。与 S 组比较, P 组各浓度组细胞活力明显增强($P<0.01$),且在一定范围内(0.001~1 $\mu\text{mol/L}$)呈浓度依赖性,而与 P 组中的 1 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮组比较, U 组细胞活力明显减弱($P<0.01$)(图 2)。后续 P 组采用孕酮浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

TUNEL 染色法检测细胞凋亡 TUNEL 染色可见 C 组出现少量的神经元凋亡, S 组出现较多的神经元凋亡,细胞凋亡率明显高于 C 组($P<0.01$)。P 组凋亡细胞明显少于 S 组,细胞凋亡率明显低于 S 组($P<0.01$)。U 组见较多凋亡细胞,细胞凋亡率明显高于 P 组($P<0.01$)(图 3—4)。

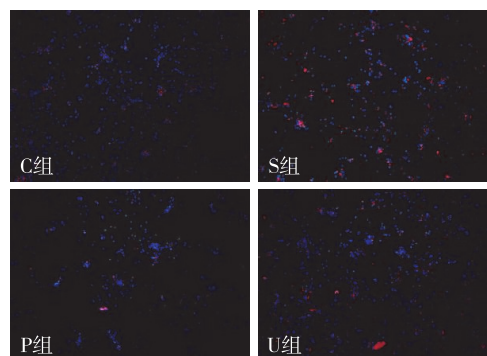
细胞形态学变化 C 组细胞形态正常, S 组和 U 组细胞出现皱缩,胞体破裂,正常形态消失,而 P 组细胞形态基本正常,皱缩破裂的细胞较少(图 5)。

p-Akt/Akt 比值 S 组 p-Akt 蛋白含量和 p-Akt/Akt 比值明显低于 C 组($P<0.01$), P 组则明显高于 S 组($P<0.01$),而 U 组明显低于 P 组($P<0.01$)(图 6)。



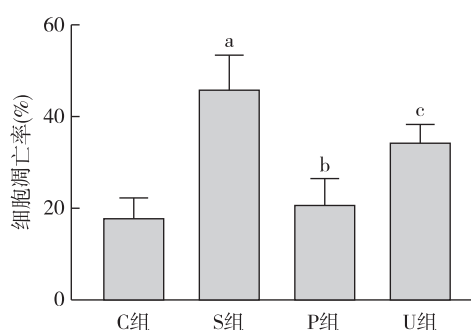
注:与 C 组比较,^a $P<0.01$;与 S 组比较,^b $P<0.01$;与 1 $\mu\text{mol/L}$ 比较,^c $P<0.01$

图 2 不同浓度孕酮和醋酸乌利司他对七氟醚损伤海马神经元细胞活力的比较



注:凋亡细胞用 TUNEL 标记发红色荧光;细胞核用 DAPI 标记发蓝色荧光

图 3 荧光显微镜下观察原代海马神经元的凋亡图($\times 100$)



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

图 4 四组细胞凋亡率的比较

讨 论

七氟醚作为儿科及产科手术中最常用的麻醉药之一,近年来越来越多的证据提示其对发育期大

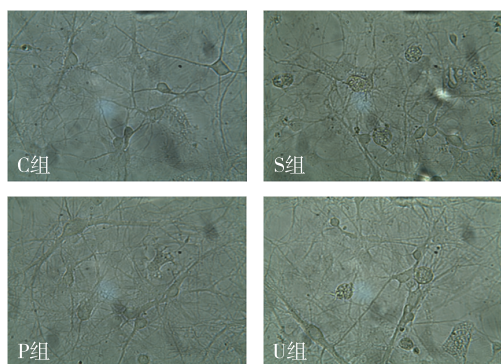
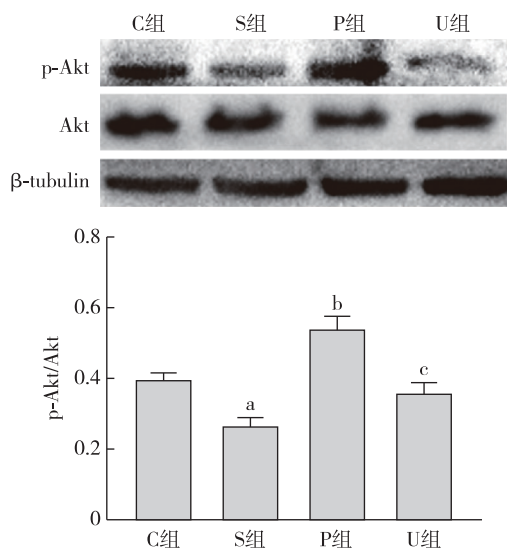


图 5 原代海马神经元细胞形态变化的光镜图($\times 400$)



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

图 6 四组细胞 p-Akt/Akt 比值的比较

脑具有神经损害作用^[8],引起病理改变包括氧化应激、神经炎症、神经细胞凋亡及突触性状改变等^[9],尤其是重复多次的七氟醚暴露将造成新生鼠海马体积、海马区神经元数量及树突长度的减少^[10]。然而七氟醚的神经毒性也存在一定争议,有研究者表明低浓度七氟醚早期暴露可促进海马神经元生成,增加其突触可塑性,增强晚期空间学习记忆能力^[11],单次七氟醚暴露造成的空间记忆缺陷是可逆的^[12]。提示七氟醚的神经毒性与其作用强度,包括作用浓度、时间、重复次数等有关,低浓度短时间七氟醚暴露具有一定的安全性。本实验尝试以不同强度的七氟醚处理原代海马神经元,可见较低浓度七氟醚对神经元细胞活力的影响不甚明显,而高浓度、长时间的七氟醚暴露所表现出的神经毒性作用愈加明显。

另一方面,有研究表明七氟醚的神经毒性存在性别差异^[13],雄性大鼠在麻醉后表现出比雌性大鼠更严重的认知功能损害^[14],这可能与性别相关激素水平差异有关。而孕酮^[15-18]在多项神经病理改变中表现出神经保护作用,如调节认知功能、抗焦虑、抑郁,调节炎症反应、线粒体功能,参与调节神经元凋亡、再生、髓鞘形成以及修复创伤性脑损伤等。但目前尚无孕酮应用于防治七氟醚神经毒性的研究,本实验使用孕酮对体外培养的原代海马神经元进行预处理,结果显示孕酮可改善七氟醚所致神经元活力下降,降低细胞凋亡率,提高 Akt 蛋白磷酸化水平,保持细胞正常形态,提示孕酮可在一定程度上拮抗七氟醚所致细胞凋亡过程,发挥对细胞的保护作用,且与其上调 Akt 通路有关。

同时,既往研究^[19]也指出孕酮受体在神经保护作用中扮演了重要角色,Zhang 等^[16]研究孕酮可以通过孕酮受体和(或)Src-ERK、PI3K 通路促进新生神经元存活。本实验中使用醋酸乌利司他作为孕酮受体拮抗剂,探究孕酮受体在孕酮的神经保护作用中发挥的作用。结果显示,醋酸乌利司他可部分拮抗孕酮的神经保护效应,提示孕酮的神经保护作用可能不完全是通过孕酮受体发挥的,孕酮的神经保护作用也可能涉及其他受体,如 GABA_A受体^[20]等,同时醋酸乌利司他也可拮抗孕酮所致的 p-Akt 表达上调,提示孕酮可能是通过孕酮受体来调节 Akt 信号通路的,具体机制还需进一步研究。

综上所述,孕酮可减轻七氟醚诱导的原代海马神经元损伤,且部分与其结合孕酮受体上调 Akt 蛋白磷酸化水平有关。

参 考 文 献

- [1] Kolb B, Mychasiuk R, Gibb R. Brain development, experience, and behavior. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(10): 1720-1723.
- [2] Seubert CN, Zhu W, Pavlinec C, et al. Developmental effects of neonatal isoflurane and sevoflurane exposure in rats. *Anesthesiology*, 2013, 119(2): 358-364.
- [3] Zhang M, Wu J, Ding H, et al. Progesterone provides the pleiotropic neuroprotective effect on traumatic brain injury through the Nrf2/ARE signaling pathway. *Neurocrit Care*, 2017, 26(2): 292-300.
- [4] Pan ZY, Zhao YH, Huang WH, et al. Effect of progesterone administration on the prognosis of patients with severe traumatic brain injury: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 265-273.
- [5] Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, et al. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*, 2008,

- 29(2): 313-339.
- [6] Zhang J, Dong Y, Zhou C, et al. Anesthetic sevoflurane reduces levels of hippocalcin and postsynaptic density protein 95. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 853-863.
 - [7] Xu J, Mathena RP, Xu M, et al. Early developmental exposure to general anesthetic agents in primary neuron culture disrupts synapse formation via actions on the mTOR pathway. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8).
 - [8] Goyagi T. Erythropoietin reduces neurodegeneration and long-term memory deficits following sevoflurane exposure in neonatal rats. *Neurotox Res*, 2019, 36(4): 817-826.
 - [9] Chai D, Cheng Y, Jiang H. Fundamentals of fetal toxicity relevant to sevoflurane exposures during pregnancy. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 72: 31-35.
 - [10] Azimaraghi O, Nezhad Sistani M, Abdollahifar MA, et al. Effects of repeated exposure to different concentrations of sevoflurane on the neonatal mouse hippocampus. *Rev Bras Anesthesiol*, 2019, 69(1): 58-63.
 - [11] Chen X, Zhou X, Yang L, et al. Neonatal exposure to low-dose (1.2%) sevoflurane increases rats' hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity in later life. *Neurotox Res*, 2018, 34(2): 188-197.
 - [12] Sun GY, Xie K, Sun ZY, et al. Sevoflurane induces temporary spatial working memory deficits and synaptic ultrastructure impairments in the hippocampus of neonatal rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(6): 2620-2629.
 - [13] Ju X, Jang Y, Heo JY, et al. Anesthesia affects excitatory/inhibitory synapses during the critical synaptogenic period in the hippocampus of young mice: Importance of sex as a biological variable. *Neurotoxicology*, 2019, 70: 146-153.
 - [14] Xie H, She GM, Wang C, et al. The gender difference in effect of sevoflurane exposure on cognitive function and hippocampus neuronal apoptosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(4): 647-657.
 - [15] Andrabi SS, Parvez S, Tabassum H. Progesterone induces neuroprotection following reperfusion-promoted mitochondrial dysfunction after focal cerebral ischemia in rats. *Dis Model Mech*, 2017, 10(6): 787-796.
 - [16] Zhang Z, Yang R, Zhou R, et al. Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice. *Hippocampus*, 2010, 20(3): 402-412.
 - [17] Fabres RB, da Rosa LA, de Souza SK, et al. Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(3): 813-821.
 - [18] Qin Y, Chen Z, Han X, et al. Progesterone attenuates A β (25-35)-induced neuronal toxicity via JNK inactivation and progesterone receptor membrane component 1-dependent inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 154: 302-311.
 - [19] Liu A, Margail I, Zhang S, et al. Progesterone receptors: a key for neuroprotection in experimental stroke. *Endocrinology*, 2012, 153(8): 3747-3757.
 - [20] Mendell AL, Chung B, Creighton CE, et al. Neurosteroid metabolites of testosterone and progesterone differentially inhibit ERK phosphorylation induced by amyloid β in SH-SY5Y cells and primary cortical neurons. *Brain Res*, 2018, 1686: 83-93.

(收稿日期:2019-07-10)