

[文章编号] 1000-4718(2007)08-1547-04

# 异丙酚对缺血再灌注损伤大鼠海马氨基酸递质水平变化及神经元凋亡的影响

郭建荣<sup>1</sup>, 岳云<sup>2</sup>, 崔健君<sup>3</sup>, 廖丽君<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 宁波大学医学院附属李惠利医院麻醉科, 浙江 宁波 315040; <sup>2</sup> 首都医科大学附属北京朝阳医院麻醉科, 北京 100020; <sup>3</sup> 中国医科大学附属第二医院麻醉科, 辽宁 沈阳 110004)

**[摘要]** 目的: 观察异丙酚对脑缺血再灌注损伤大鼠海马组织氨基酸递质水平变化及神经元凋亡的影响。方法: 雄性 Wistar 大鼠 60 只, 随机等分为假手术(A)组、缺血再灌注对照(B)组和异丙酚处理(C)组, 后者按异丙酚用量又分为 50 mg/kg(C<sub>1</sub>)、100 mg/kg(C<sub>2</sub>)和 150 mg/kg(C<sub>3</sub>)3 个亚组。全脑缺血 10 min 再灌注 60 min 时, 各组断头处死大鼠 6 只, 检测海马组织中氨基酸水平的变化; 于再灌注 72 h 时, 断头处死余下大鼠, 用流式细胞仪检测海马组织神经细胞凋亡指数(AI), 光镜检测海马 CA1 区神经元凋亡的密度。结果: 与假手术组比较, 各组海马组织谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)含量有不同程度的增高,  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)、甘氨酸(Gly)的含量有不同程度的降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。异丙酚组海马组织 Glu、Asp 含量低于对照组, GABA、Gly 的含量高于对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。再灌注 72 h 时, 各组海马组织神经细胞 AI 有不同程度的增高, 海马 CA1 区神经元凋亡密度明显增加。异丙酚组海马组织神经细胞凋亡数量明显减少。结论: 异丙酚对脑缺血再灌注损伤的拮抗作用可能与其抑制兴奋性氨基酸的释放、降低抑制性氨基酸的耗竭、继而减少神经元的凋亡、提高神经元的存活数目有关。

**[关键词]** 二异丙酚; 脑缺血; 再灌注损伤; 氨基酸类; 细胞凋亡; 神经元

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Effects of propofol on levels of amino acid and neuronal apoptosis of hippocampus after global ischemia – reperfusion in rats

GUO Jian – rong<sup>1</sup>, YUE Yun<sup>2</sup>, CUI Jian – jun<sup>3</sup>, LIAO Li – jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Anesthesiology, Lihuli Hospital, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315040 China; <sup>2</sup> Department of Anesthesiology, Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China; <sup>3</sup> Department of Anesthesiology, Second Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China. E – mail: guomzk@yahoo.com.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effects of propofol on levels of amino acid and neuronal apoptosis of hippocampus after global ischemia – reperfusion in rats. **METHODS:** 60 male Wistar rats were randomly assigned to five groups ( twelve animals each). After global cerebral ischemia for 10 min then reperfusion for 60 min and 72 h, the animals were decapitated and the brains were removed respectively. HPLC was adopted to measure the contents of amino acids in hippocampus. The density of apoptosis neurons in the hippocampal CA1 subfield was evaluate with light microscope. Flow cytometry technique was applied to detect the neuronal apoptosis index in the hippocampus. **RESULTS:** The contents of Glu and Asp increased markedly and the levels of GABA and Gly decreased obviously in hippocampus after ischemia – reperfusion. The levels of Glu and Asp were lower in propofol group than those in control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the contents of GABA and Gly were higher in propofol group than those in control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Apoptosis index and density of apoptosis neurons in the hippocampus were higher in control group than those in propofol group. **CONCLUSION:** Propofol inhibits neuronal apoptosis of hippocampus after global ischemia – reperfusion, and suppresses the excessive release of excitory amino acids and the exhaustion of inhibitory amino acids in hippocampus after ischemia – reperfusion. Its mechanism may be related with decreasing the neuronal apoptosis.

**[KEY WORDS]** Propofol; Brain ischemia; Reperfusion injury; Amino acids; Apoptosis; Neurons

[收稿日期] 2005-11-22

[修回日期] 2006-04-30

Tel: 0574-87018725; E-mail: guomzk@yahoo.com.cn

早期的研究认为麻醉药引起的脑保护效应与脑代谢的抑制有关,因为麻醉药能降低脑代谢从而改善脑氧供需平衡<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,各种麻醉药产生的脑保护程度并不与它们所引起的脑代谢降低幅度成比例<sup>[2]</sup>。越来越多的证据表明兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAAs)在脑缺血再灌注损伤的病理发展机制中起着关键作用。有研究表明,细胞死亡可通过细胞凋亡和坏死 2 条途径。因此,应用各种手段抑制凋亡的发生、提高神经元的存活率成为围术期研究脑缺血再灌注损伤的新课题<sup>[3]</sup>。本研究拟观察异丙酚对大鼠脑缺血再灌注损伤后海马组织氨基酸类递质水平的变化以及再灌注迟发性损伤阶段神经元凋亡的影响,以进一步探讨异丙酚脑保护作用的机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物模型的建立

参照 Pulsinelli 等<sup>[4]</sup>介绍的方法并做一定改动,建立大鼠全脑缺血再灌注损伤模型。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,颈后切开暴露第 1 颈椎翼孔,直径 0.5 mm 的大头针烧灼双侧翼孔内椎动脉,显微镜证实双侧椎动脉确已凝断后,翻转大鼠行颈部切开,用丝线环套双侧颈总动脉,缝合伤口后放回保温鼠笼。术后 24 h 腹腔注射生理盐水(NS)或异丙酚。收紧双丝线造成大鼠全脑缺血。以动物出现静息脑电波、双侧瞳孔散大和翻正反射消失为全脑缺血成功的标志。缺血 10 min 后,松开丝线恢复脑血流再灌注。实验全程保持大鼠直肠温度在  $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 2 实验动物与分组

雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 250 - 300 g,3 - 4 月龄,由中国医科大学实验动物中心提供。将动物随机分为 5 组,每组 12 只。假手术(A)组:仅分离椎动脉及颈总动脉,腹腔注射 NS 5 mL;缺血 - 再灌注对照(B)组:全脑缺血 10 min,缺血前 10 min 腹腔注射 NS 5 mL;缺血 - 再灌注异丙酚预处理(C)组:按异丙酚用量又分为  $C_1$  (50 mg/kg)、 $C_2$  (100 mg/kg) 和  $C_3$  (150 mg/kg) 3 个亚组,总量用 NS 配至 5 mL,缺血前 10 min 腹腔注射。

### 3 检测方法

**3.1 样品取材** 再灌注 60 min 时,各组断头处死大鼠 6 只,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  迅速分离出海马组织,置于液氮中冷冻,  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存用于氨基酸含量的检测;于再灌注 72 h 时,断头处死余下大鼠,取海马组织用于流式细胞仪(FCM)检测神经细胞凋亡指数;在视

交叉后 1 mm 至 4 mm 处冠状面切开鼠脑,取中间块置于 10% 中性甲醛缓冲液固定,石蜡包埋,用于 HE 染色。

**3.2 海马组织氨基酸含量测定** 称取海马组织 50 mg,按 1:10 比例加入 HCl,置冰浴中,超声粉碎,将匀浆在  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  静置 30 min,然后在  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  离心( $11\,400 \times g$ ) 10 min 后取 200  $\mu\text{L}$  上清液加入离心式滤管中, $9\,310 \times g$  离心 15 min 后取离心管底部滤液 20  $\mu\text{L}$ ,加入一定量内标进行衍生处理。测定方法参照文献介绍的 HPLC 方法<sup>[5]</sup>。

**3.3 神经细胞凋亡指数测定** 常规制备样品,上机前用 200 目尼龙网过滤,应用 FCM 记录氩离子激发光 488 nm 处红色荧光,每个样品记数 10 000 个细胞;用 Cell Quest 分析软件绘制细胞数和凋亡细胞分布图,计算凋亡细胞占所测细胞总数的百分比(即凋亡指数, AI)。

**3.4 海马 CA1 区凋亡神经元密度的检测** 脑标本冠状面取材,经常规固定、脱水、透明、浸蜡、切片过程,行 HE 染色,400 倍光镜下计数海马 CA1 区凋亡神经元密度,计算方法如下:

$$\text{海马 CA1 区凋亡神经元密度} = \frac{\text{海马 CA1 区凋亡神经元数}}{\text{海马 CA1 区长度}} (\text{number/mm})$$

### 4 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 统计分析软件进行数据处理。计量资料用  $t$  检验及 ANOVA 检验,计数资料用  $\chi^2$  检验。

## 结 果

### 1 各组海马组织氨基酸水平的变化

全脑缺血 10 min 再灌注 60 min 时,各组海马组织 Glu、Asp 含量不同程度地高于假手术组, GABA、Gly 的含量不同程度地低于假手术组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其中,以 B 组变化最为显著;异丙酚组 Glu、Asp 的含量不同程度地低于对照组, GABA、Gly 的含量不同程度地高于对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。  $C_1 - C_3$  组间虽有差异但无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2 FCM 检测结果

缺血再灌注后,各组海马组织神经细胞 AI 有不同程度的增高。其中,以 B 组 ( $13.41\% \pm 3.24\%$ ) 最为显著,与 A 组 ( $3.65\% \pm 1.58\%$ ) 比较差异显著 ( $P < 0.01$ );异丙酚各组的海马组织神经细胞 AI 明显低于 B 组,  $C_1 - C_3$  组的 AI 分别为  $9.16\% \pm 2.57\%$ 、 $6.78\% \pm 2.32\%$  和  $5.84\% \pm 1.98\%$ ,与 B 组

比较差异显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );  $C_2$ 、 $C_3$  组间比较差异不显著( $P > 0.05$ ), 与  $C_1$  组比较则差异显著( $P < 0.05$ ), 见图 1。

表 1 各组海马组织氨基酸含量的变化

Tab 1 Changes of amino acid in hippocampus in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	Glu ( $\mu\text{mol/g}$ )	Asp ( $\mu\text{mol/g}$ )	Gly ( $\mu\text{mol/g}$ )	GABA ( $\mu\text{mol/g}$ )
Sham	11.23 $\pm$ 2.21	3.84 $\pm$ 0.82	2.69 $\pm$ 0.56	4.82 $\pm$ 0.72
Control	14.96 $\pm$ 2.26 <sup>▲</sup>	5.88 $\pm$ 1.12 <sup>▲▲</sup>	1.86 $\pm$ 0.54 <sup>▲</sup>	3.23 $\pm$ 0.74 <sup>▲</sup>
Propofol (50 mg/kg)	12.25 $\pm$ 2.37*	4.63 $\pm$ 0.78*	2.27 $\pm$ 0.68	4.01 $\pm$ 0.75
Propofol (100 mg/kg)	11.89 $\pm$ 2.57*	4.22 $\pm$ 0.84**	2.43 $\pm$ 0.57	4.41 $\pm$ 0.83*
Propofol (150 mg/kg)	11.74 $\pm$ 2.43*	4.16 $\pm$ 0.83**	2.47 $\pm$ 0.77	4.43 $\pm$ 0.93*

▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$  vs sham operation group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

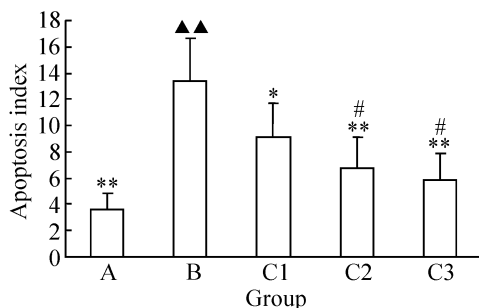


Fig 1 The changes of apoptosis index in hippocampus of each group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . ▲▲ $P < 0.01$  vs group A; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs group B; # $P < 0.05$  vs group C1.

图 1 各组海马组织神经细胞的凋亡指数变化

### 3 海马 CA1 区凋亡神经元密度

A 组海马 CA1 区锥体细胞保持完好, 未见明显凋亡神经细胞; 缺血再灌注后海马 CA1 区部分锥体细胞发生萎缩、核固缩, 细胞浆出现深染, 空泡损害, 放射状纹状区发生结构破坏等神经元凋亡的特征。其中, B 组海马 CA1 区变化最显著, 凋亡神经元密度为(42.24  $\pm$  7.52) 个/mm; 异丙酚处理组海马 CA1 区神经细胞损伤程度明显减轻, 凋亡神经元的密度显著低于 B 组,  $C_1 - C_3$  组海马 CA1 区凋亡神经元密度分别为(21.87  $\pm$  2.16) 个/mm、(17.52  $\pm$  1.87) 个/mm 和 (16.34  $\pm$  1.65) 个/mm, 与 B 组比较有显著差异( $P < 0.01$ ), 见图 2。

## 讨 论

海马结构是脑缺血后选择性易损部位, 脑缺血再灌注时传入海马的 Glu 能神经末梢释放的 Glu 对神经元产生兴奋性毒性, 是造成海马神经元选择性损伤的决定性因素<sup>[6]</sup>。既往的研究表明, 短暂全脑缺血后, 海马区的神经元在几分钟至数小时内看似完全恢复, 但在 48 - 72 h 后大多数的神经元死亡, 这

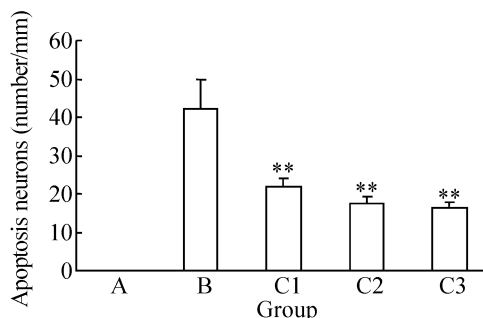


Fig 2 The changes of density of apoptosis neurons in the hippocampal CA1 subfield.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$  vs B group.

图 2 各组海马 CA1 区凋亡神经元密度变化

种延迟性神经元死亡即是细胞凋亡。现有的研究表明, 全脑缺血再灌注期间 EAAs 过度释放的根本原因是脑组织灌流量严重不足或完全中断, 使 ATP 迅速耗竭, 同时合成受阻; 另一方面缺血区内流的钙大量沉积于脑组织线粒体内, 干扰氧化磷酸化过程, 加重能量代谢障碍, 抑制质膜上  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ , 使膜电位下降, 神经元去极化, 导致 EAAs 大量释放, 并抑制 EAAs 重摄取<sup>[7]</sup>。抑制性氨基酸(主要是 GABA)虽可拮抗 EAAs 的毒性, 但脑缺血再灌注损伤后抑制性氨基酸代偿性过度释放, 可出现抑制性氨基酸耗竭, 导致原发性降低, 这也是缺血后神经元发生延迟性死亡的主要原因之一<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 异丙酚预处理可降低 EAAs 的释放, 减轻兴奋毒性, 同时使缺血再灌注后已降低的 GABA、Gly 水平有不同程度的恢复, 说明异丙酚可减轻抑制性氨基酸的耗竭, 提高神经元的保护性抑制, 继而减少海马区神经细胞的凋亡。

Grasshoff 等<sup>[9]</sup> 研究认为异丙酚可能通过抑制 NMDA 受体通道活性, 减弱兴奋性突触后电流, 或直接抑制 Glu 介导的兴奋性突触传递而产生脑保护作用。Yamaguchi 等<sup>[10]</sup> 的研究显示, 异丙酚对沙鼠短暂前脑缺血再灌注后海马 CA1 区的 DND 具有保护作用, 因为 CA1 区分布有大量的 NMDA 受体, 大量释放的 Glu 可影响 DND 的发生和发展, 推测异丙酚的脑保护作用与抑制 NMDA 受体有关。Hans 等<sup>[11]</sup> 在培养的海马神经元中研究证实, 异丙酚可减轻 NMDA 受体介导的神经毒性, 认为该作用是通过异丙酚的苯环基团非竞争性拮抗 NMDA 受体实现的, 推测异丙酚通过抑制 Glu 触发的细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  增加而发挥脑保护作用。Kodaka 等<sup>[12]</sup> 在大鼠全脑缺血再灌注模型上研究显示, 异丙酚可明显减轻缺血再灌注后延迟阶段海马 CA1 区神经元的凋亡。Ito 等<sup>[13]</sup> 的研究显示, 异丙酚可能通过激活 GABAA 受体, 对

海马神经细胞产生保护作用。EAAAs 堆积不仅可以促使自由基生成增加,而且自由基又可进一步加剧 EAAAs 积聚。它们之间可以相互作用而加重缺血后的损伤。而异丙酚可直接清除自由基、抑制脂质过氧化反应、调节钙离子平衡、降低组织氧耗<sup>[14]</sup>,并能增加细胞内谷胱甘肽含量<sup>[15]</sup>,从而直接阻断凋亡发生的生化反应。

[参 考 文 献]

- [1] Ergun R, Akdemir G, Sen S, et al. Neuroprotective effects of propofol following global cerebral ischemia in rats [J]. *Neurosurg Rev*, 2002, 25(1-2): 95-98.
- [2] Turner BK, Wakim JH, Secrest J, et al. Neuroprotective effects of thiopental, propofol, and etomidate [J]. *AANA J*, 2005, 73(4): 297-302.
- [3] 刘慧敏, 崔鹤, 刘亚君, 等. 缺血预处理经抑制 p53 表达减轻缺血再灌后大鼠海马神经元损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(3): 515-519.
- [4] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267-272.
- [5] 唐志毅, 许维桂, 杨振华, 等. 体液游离氨基酸反相高效液相色谱测定法 [J]. *中华医学检验杂志*, 1994, 17(3): 140-143.
- [6] Perez Velazquez JL, Frantseva MV, Carlen PL. *In vitro* ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons [J]. *J Neurosci*, 1997, 17(23): 9085-9094.
- [7] Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 79(1-2): 231-239.
- [8] Chen Q, Moulder K, Tenkova T, et al. Excitotoxic cell death dependent on inhibitory receptor activation [J]. *Exp Neurol*, 1999, 160(1): 215-255.
- [9] Grasshoff C, Gillessen T. Effects of propofol on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium increase in cultured rat cerebrocortical neurons [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2005, 22(6): 467-470.
- [10] Yamaguchi S, Midorikawa Y, Okuda Y, et al. Propofol prevents delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils [J]. *Can J Anesth*, 1999, 46(6): 593-598.
- [11] Hans P, Bonhomme V, Collette J, et al. Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity [J]. *J Neurosurg Anesth*, 1994, 6(4): 249-253.
- [12] Kodaka M, Mori T, Tanaka K, et al. Depressive effects of propofol on apoptotic injury and delayed neuronal death after forebrain ischemia in the rat: comparison with nitrous oxide-oxygen-isoflurane [J]. *Masui*, 2000, 49(2): 130-138.
- [13] Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, et al. Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on GABAA receptors [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1999, 43(2): 153-162.
- [14] Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2002, 14(1): 66-79.
- [15] De La Cruz JP, Zanca A, Carmona JA, et al. The effects of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients [J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(4): 1050-1055.