

丙泊酚通过MAPK/ERK信号通路对谷氨酸诱导的神经PC12细胞损伤的抑制作用

李 峰*,高项羽,刘 喆,梁 楠,南 征(南阳市中心医院,河南南阳 473000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0061-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.20

摘要 目的:研究丙泊酚通过丝裂原激活的蛋白激酶/胞外信号调节的蛋白激酶(MAPK/ERK)信号通路对谷氨酸诱导的神经PC12细胞损伤的抑制作用。方法:取PC12细胞分为正常对照组、模型(10 mmol/L谷氨酸)组和丙泊酚低、中、高浓度(12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ +10 mmol/L谷氨酸)组,分别加入相应药物,培养48 h后,检测各组细胞的光密度、凋亡情况和细胞中ERK1/2磷酸化水平及c-fos、Bax、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)的表达情况。结果:与正常对照组比较,模型组细胞的细胞光密度、磷酸化ERK1/2、Bcl-2表达均降低($P<0.01$),凋亡率、c-fos和Bax表达均升高($P<0.01$)。与模型组比较,丙泊酚低、中、高浓度组细胞的光密度、磷酸化ERK1/2、Bcl-2表达均升高($P<0.01$),凋亡率、c-fos和Bax表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且各浓度间差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:丙泊酚可抑制谷氨酸诱导的PC12细胞凋亡,其可能与上调ERK1/2磷酸化水平有关。

关键词 丙泊酚;神经PC12细胞;凋亡;丝裂原激活的蛋白激酶/胞外信号调节的蛋白激酶信号通路

Inhibitory Effects of Propofol on PC12 Cells Injury Induced by Glutamic Acid via MAPK/ERK Signal Pathway

LI Zheng, GAO Xiangyu, LIU Zhe, LIANG Nan, NAN Zheng (Nanyang Central Hospital, Henan Nanyang 473000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study inhibitory effects of propofol on PC12 cells injury induced by glutamic acid via mitogen-activated protein kinase/extra-cellular regulated kinase (MAPK/ERK) signal pathway. **METHODS:** PC12 cells were randomized into normal control group, model group (10 mmol/L glutamic acid), propofol low-concentrations, medium-concentrations and high-concentrations groups (12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$ +10 mmol/L glutamic acid). The optical density of cells, cell apoptosis, the phosphorylation of ERK1/2 and the expression of c-fos, Bax, Bcl-2 were detected after treated with relevant medicine for 48 h. **RESULTS:** Compared with normal control group, optical density of cells, the phosphorylation of ERK1/2 and Bcl-2 decreased in model group ($P<0.01$); apoptotic rate, the expression of c-fos and Bax increased ($P<0.01$). Compared with model group, optical density of cells, the expression of Bcl-2 and the phosphorylation of ERK1/2 increased in propofol group ($P<0.01$); apoptosis rate, the expression of c-fos and Bax decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). There were statistical significant between the different concentrations ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Propofol can inhibit the apoptosis of PC12 cells induced by glutamic acid, which is associated with the up-regulation of ERK1/2 phosphorylation.

KEYWORDS Propofol; PC12 cells; Apoptosis; Mitogen-activated protein kinase/extra-cellular regulated kinase signal pathway

PC12细胞为小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,其结构、形态、生理和生化功能类似于神经元,是目前广泛用于研究神经细胞功能、分化发育及凋亡的一种细胞培养模型^[1]。谷氨酸诱导PC12细胞损伤模型并用于神经系统相关疾病的探讨已被广泛报道^[2]。丙泊酚是一种静脉麻醉药,因起效快、苏醒迅速、平稳、副作用少而被广泛应用于临床,其具有神经系统保护作用,如能显著抑制缺氧海马神经元凋亡^[3]及百草枯引起的PC12细胞氧化应激损伤^[4],但具体作用机制未知。丝裂原激活的蛋白激酶/胞外信号调节的蛋白激酶(MAPK/ERK)信号通路是细胞内的重要信号通路,参与细胞的增殖、分化、凋亡及细胞周期调控。ERK信号转导途径主要调节细胞的增殖、分化,有5个亚家族,其中ERK1和ERK2途径是ERK家族中研究最彻底的,其表达广泛,涉及调节不同细胞内包括减数分裂、有丝分裂等过程。已有研究证实,丙泊酚能通过激活胞外信号调节的蛋白激酶(ERK1/2)磷酸化抑制氧化应激诱发的心肌细胞损伤^[5]。因此,笔者推测丙泊酚也能通过MAPK/ERK信号通路抑制谷氨酸诱导的PC12细胞损伤,本文就此应用谷氨酸诱导PC12细胞损伤模型,验证丙泊酚的损伤抑制作用及机制。

1 材料

* 主治医师。研究方向:临床麻醉。电话:0377-63200134。E-mail: lizhengyisheng@163.com

1.1 仪器

FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司);Tecan Infinite F200/M200型多功能酶标仪(瑞士Tecan集团公司);ChemiDoc™ XRS型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);AF6000型荧光显微镜(德国Leica公司);BSA/24S型电子天平、PB-10型pH计(北京赛多利斯科学仪器有限公司);CO₂培养箱、超净工作台、超低温冰箱(美国Thermo Scientific公司)。

1.2 药品与试剂

丙泊酚注射液(西安力邦制药有限公司,批号:10FG9984,规格:20 ml:200 g);谷氨酸片(天津力生制药股份有限公司,批号:1006007,规格:每片0.5 g);二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量试剂盒(批号:P0010)、小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、Hoechst染色试剂盒、Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究所);兔抗c-fos、Bax、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、ERK1/2及其磷酸化(p-ERK1/2)单克隆抗体(美国Epitomics公司)。

1.3 细胞

大鼠PC12细胞购于中国科学院上海细胞库,培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中。

2 方法

2.1 分组与给药

试验分为正常对照组、模型组和丙泊酚低、中、高浓度组。正常对照组加入不含药的培养基,模型组加入含10 mmol/L谷氨酸的培养基,丙泊酚低、中、高浓度组分别加入12.5、25、50 μmol/L丙泊酚+10 mmol/L谷氨酸的培养基。

2.2 细胞活性的检测

采用MTT法测定细胞活性。将处于生长对数期的PC12细胞消化,调整细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔板,于37℃、5%CO₂培养箱中培养48h。然后按“2.1”项下方法分组并加入含相应药物的培养基,继续培养48h,每孔加MTT(5 mg/ml)20 μl培养4h,弃上清,每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μl培养10 min。用酶标仪于570 nm波长处测定光密度(OD)。

2.3 细胞凋亡形态的观察

将处于生长对数期的PC12细胞消化,调整细胞密度为 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,接种于6孔板,于37℃、5%CO₂培养箱中培养48h。然后按“2.1”项下方法分组并加入含相应药物的培养基,继续培养48h。按照Hoechst染色试剂盒说明书进行操作、染色、固定,显微镜下观察各组细胞凋亡形态。

2.4 细胞凋亡率的检测

按“2.3”项下方法分组、加药、培养48h,再按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法,用0.25%的胰蛋白酶消化心肌组织,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,以离心半径为15 cm、2 000 r/min离心5 min,收集细胞。按顺序分别加入500 μl结合缓冲液(Binding buffer)、5 μl Annexin V-FITC及5 μl PI,混匀,于室温避光反应10 min。在1 h内采用流式细胞仪检测细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率。

2.5 MAPK/ERK信号通路及相关因子的检测

按“2.3”项下方法分组、加药、培养48h,收集细胞,加入RIPA裂解液,裂解,以离心半径为15 cm、10 000 r/min离心10 min,收获蛋白。根据BCA法蛋白定量试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,十二烷基硫酸钠凝胶电泳,湿法转膜,加入一抗(兔抗c-fos、Bax、Bcl-2、ERK1/2、p-ERK1/2单克隆抗体)孵育,4℃过夜;漂洗后,加入二抗室温孵育1~2h,漂洗,滴加电化学发光(ECL)曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用Quantity One软件对各抗体条带的灰度值进行统计。以兔抗c-fos、Bcl-2、Bax与GAPDH灰度值的比值表示相应蛋白的相对表达量;以p-ERK1/2与ERK1/2灰度值的比值表示ERK1/2的磷酸化水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用t检验,多组间比较采用One-way ANOVA统计方法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞活性变化

与正常对照组比较,模型组细胞的OD值降低($P < 0.01$);与模型组比较,丙泊酚低、中、高浓度组细胞的OD值升高($P < 0.01$);与丙泊酚低浓度组比较,丙泊酚中、高浓度组细胞的OD值升高($P < 0.01$);与丙泊酚中浓度组比较,丙泊酚高浓度组细胞的OD值升高($P < 0.01$)。各组细胞OD值的测定结果见图1。

3.2 细胞凋亡情况

Hoechst染色结果所示,与正常对照组比较,模型组细胞凋亡数增加($P < 0.01$);与模型组比较,丙泊酚低、中、高浓度组细胞的凋亡数降低($P < 0.01$);与丙泊酚低浓度组比较,丙泊酚中、高浓度组细胞的凋亡数降低($P < 0.01$);与丙泊酚中浓度组比较,丙泊酚高浓度组细胞的凋亡数降低($P < 0.01$)。各组细胞凋亡的Hoechst染色图见图2。

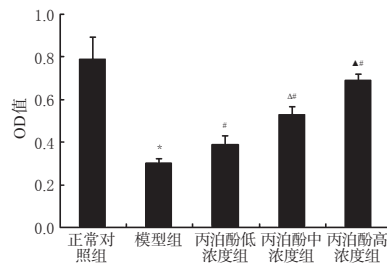


图1 各组细胞OD值的测定结果

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$;与丙泊酚低浓度组比较,Δ $P < 0.01$;与丙泊酚中浓度组比较,▲ $P < 0.01$

Fig 1 The OD value of cells in each group

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.01$; vs. propofol low-concentrations group, Δ $P < 0.01$; vs. propofol medium-concentrations group, ▲ $P < 0.01$

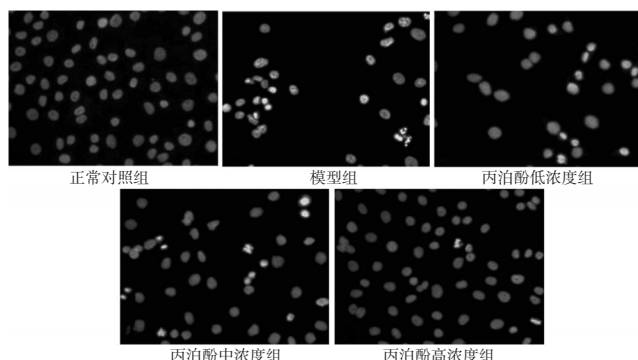


图2 各组细胞凋亡的Hoechst染色图(×200)

Fig 2 Cell apoptosis of each group detected by Hoechst staining(×200)

Annexin V-FITC/PI流式双染结果显示,与正常对照组比较,模型组细胞早期凋亡率和晚期凋亡率升高($P < 0.01$);与模型组比较,丙泊酚低、中、高浓度组细胞早期凋亡率和晚期凋亡率降低($P < 0.01$);与丙泊酚低浓度组比较,丙泊酚中、高浓度组细胞早期凋亡率和晚期凋亡率降低($P < 0.01$);与丙泊酚中浓度组比较,丙泊酚高浓度组细胞早期凋亡率和晚期凋亡率降低($P < 0.01$)。各组细胞凋亡率的测定结果见表1。

表1 各组细胞凋亡率的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 The cell apoptosis rate in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	早期凋亡率,%	晚期凋亡率,%
正常对照组	1.20 ± 0.15	3.25 ± 0.15
模型组	18.23 ± 1.12*	15.45 ± 1.21*
丙泊酚低浓度组	15.16 ± 0.88#	10.42 ± 0.97#
丙泊酚中浓度组	10.50 ± 1.04 ^Δ	5.50 ± 0.34 ^Δ
丙泊酚高浓度组	5.34 ± 0.43 ^Δ ▲	3.34 ± 0.37 ^Δ ▲

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$;与丙泊酚低浓度组比较,Δ $P < 0.01$;与丙泊酚中浓度组比较,▲ $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.01$; vs. propofol low-concentrations group, Δ $P < 0.01$; vs. propofol medium-concentrations group, ▲ $P < 0.01$

3.3 细胞中c-fos、Bax及Bcl-2蛋白表达测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞中Bcl-2表达降低,c-fos、Bax表达增强($P < 0.01$);与模型组比较,丙泊酚低、中、高浓度组细胞中Bcl-2表达增强,c-fos表达降低,丙泊酚中、高浓度组Bax表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与丙泊酚低浓度组比较,丙泊酚中、高浓度组细胞中Bcl-2表达增强,c-fos、Bax表达降低($P < 0.01$);与丙泊酚中浓度组比较,丙泊酚高浓度组细胞中c-fos表达降低($P < 0.01$)。各组细胞c-fos、Bax及Bcl-2蛋白表

电泳图见图3,测定结果见表2。



图3 各组细胞的电泳图

A. c-fos、Bax、Bcl-2 蛋白表达; B. ERK1/2 磷酸化水平

Fig 3 Electrophoretogram of cells in each group

A. the expression of c-fos, Bax and Bcl-2 protein; B. ERK1/2 phosphorylation

表2 各组细胞中 c-fos、Bax、Bcl-2 蛋白表达与 ERK1/2 的磷酸化水平的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 The expression of c-fos, Bax and Bcl-2 protein and ERK1/2 phosphorylation of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	c-fos/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	p-ERK1/2/ERK1/2
正常对照组	0.08 ± 0.00	0.25 ± 0.01	1.21 ± 0.05	0.99 ± 0.12
模型组	1.22 ± 0.11*	1.23 ± 0.10*	0.20 ± 0.01*	0.30 ± 0.05*
丙泊酚低浓度组	0.43 ± 0.02**	1.22 ± 0.05	0.34 ± 0.02#	0.39 ± 0.03#
丙泊酚中浓度组	0.32 ± 0.01** ^Δ	0.38 ± 0.04** ^Δ	1.03 ± 0.14** ^Δ	0.68 ± 0.09** ^Δ
丙泊酚高浓度组	0.19 ± 0.01** ^Δ	0.40 ± 0.03** ^Δ	1.04 ± 0.37** ^Δ	1.22 ± 0.13** ^Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$;与丙泊酚低浓度组比较,^Δ $P < 0.01$;与丙泊酚中浓度组比较,^Δ $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$; vs. propofol low-concentrations group, ^Δ $P < 0.01$; vs. propofol medium-concentrations group, ^Δ $P < 0.01$

3.4 细胞 ERK1/2 磷酸化水平测定结果

与正常对照组比较,模型组中细胞 ERK1/2 磷酸化水平降低($P < 0.01$);与模型组比较,丙泊酚低、中、高浓度组细胞中 ERK1/2 磷酸化水平增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与丙泊酚低浓度组比较,丙泊酚中、高浓度组细胞中 ERK1/2 磷酸化水平增加($P < 0.01$);与丙泊酚中浓度组比较,丙泊酚高浓度组细胞中 ERK1/2 磷酸化水平增加($P < 0.01$)。各组细胞 ERK1/2 磷酸化的电泳图见图3,测定结果见表2。

4 讨论

谷氨酸是哺乳动物脑内最主要的兴奋性神经递质,在神经元的分化、迁移、生长和生存过程中具有重要作用,维持着神经元正常信号传递功能。在神经元缺血缺氧等病理状态下,神经元细胞膜去极化,突触前神经元释放大量谷氨酸,导致神经元的死亡,因而谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤模型被广泛用于神经疾病体外试验研究^[2]。所以本研究采用谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤模型进行试验,结果表明,与正常对照组比较,模型组细胞活性明显降低,细胞凋亡率明显升高,与已报道文献^[2]结果一致。已有文献报道,丙泊酚能显著抑制过氧化氢(H₂O₂)诱导的心肌细胞损伤^[5]、神经母细胞 SK-N-SH 缺氧/复氧损伤^[6]、缺氧海马神经元凋亡^[3]。而且 Wilson C 等^[7]进一步报道,丙泊酚可阻滞细胞外谷氨酸浓度升高,抑制兴奋性氨基酸受体,使 Ca²⁺内流减少,进而减弱氧化还原反应而使细胞损伤减轻。因此笔者推测,丙泊酚也能显著地抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤。本研究结果也的确表明,丙泊酚能显著提高谷氨酸诱导的 PC12 细胞活性,抑制细胞凋亡,并呈浓度依赖性。

已有研究报道,谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤与细胞中 ERK 的激活情况密切相关^[8]。丙泊酚通过激活 ERK1/2 磷酸化抑制氧化应激诱发的心肌细胞损伤^[5]。因此笔者检测了丙泊

酚是否能够抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡。结果表明,丙泊酚能浓度依赖性地提高 ERK1/2 磷酸化水平,提示丙泊酚能通过上调 ERK1/2 磷酸化水平从而抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤。

正常生理情况下,ERK1/2 在静息细胞中广泛分布,但一旦 ERK1/2 激酶的磷酸化被激活后,能诱发下游细胞信号分子 Bcl-2、c-fos 的表达,从而影响细胞的增殖凋亡。Bcl-2 是抑制细胞凋亡最为关键的因素之一,能与促凋亡蛋白 Bax 形成二聚体来促进细胞凋亡或抑制细胞凋亡。c-fos 原癌基因属于即早基因,可分布于细胞核内和胞浆中,可诱导下游基因 mRNA 转录和蛋白表达,参与细胞增殖和凋亡的调控。缺血再灌注或谷氨酸损伤可引起 c-fos 的表达增加,从而促进神经元的凋亡^[9]。张彦清等^[10]证实丙泊酚能通过抑制心肌细胞凋亡及增强 Bcl-2 表达、降低 Bax 表达从而改善大鼠离体缺血/再灌注心肌细胞损伤。所以本研究检测了丙泊酚对谷氨酸诱导的 PC12 细胞中 c-fos、Bax 及 Bcl-2 表达的影响,结果表明,丙泊酚能增强 Bcl-2 表达,抑制 c-fos 及 Bax 表达,说明丙泊酚能通过调节凋亡相关蛋白水平抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡损伤。

综上所述,丙泊酚能抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤,其与上调 ERK1/2 磷酸化水平、增强 Bcl-2 表达、抑制 c-fos 及 Bax 表达有关。

参考文献

- [1] 陈晓宇,荣延平,张士军,等.玉郎伞多糖对 Aβ₍₂₅₋₃₅₎ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用研究[J].中国药房,2013,24(19):1735.
- [2] Jiang G, Wu H, Hu Y, et al. Gastrodin inhibits glutamate-induced apoptosis of PC12 cells via inhibition of CaMK II / ASK-1/p38 MAPK/p53 signaling cascade[J]. Cell Mol Neurobiol, 2014, 34(4):591.
- [3] 王可佳,彭书凌,郑俊奕.不同浓度丙泊酚对缺氧海马神经元凋亡的影响[J].中国医学工程,2009,17(12):32.
- [4] 赵艳军,冯泽国,米卫东,等.丙泊酚对百草枯引起的 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J].北京医学,2014,36(11):940.
- [5] 梁艳丽,唐敏,徐聪敏. ERK1/2 信号通路介导丙泊酚对 H₂O₂ 诱发的心肌细胞损伤保护作用[J].药学研究,2014,33(5):257.
- [6] 冯娅妮,孙艳红,马虹.丙泊酚预处理对 SK-N-SH 神经母细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J].广东医学,2013,34(22):3379.
- [7] Wilson C, Canning P, Caravati EM. The abuse potential of propofol[J]. Clin Toxicol:Phila, 2010, 48(3):165.
- [8] Tian X, Sui S, Huang J, et al. Neuroprotective effects of Arctium lappa L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38(1):189.
- [9] Luo CC, Ming YC, Chao HC, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor downregulates expression of activator protein-1 transcription factor after intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. Neonatology, 2011, 99(4):241.
- [10] 张彦清,刘保江,田首元.丙泊酚对大鼠离体缺血/再灌注心肌细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(1):55.

(收稿日期:2015-08-31 修回日期:2015-09-21)

(编辑:邹丽娟)