

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.02.006  
文章编号: 1005-8982 (2018) 02-0033-04

## 丙泊酚对小胶质细胞炎症因子的影响及其机制研究\*

叶雪飞<sup>1</sup>, 左春龙<sup>2</sup>, 梅虹霞<sup>2</sup>, 苏颖<sup>2</sup>, 杨建平<sup>1</sup>

(1. 苏州大学附属第一医院 麻醉科, 江苏 苏州 215006; 2. 温州医科大学附属第二医院 麻醉科, 浙江 温州 325000)

**摘要: 目的** 探讨丙泊酚对小胶质细胞炎症因子的影响及其机制。**方法** 将小胶质 BV-2 细胞分为对照组、丙泊酚组、脂多糖 (LPS) 组、LPS+ 丙泊酚组, 对照组细胞加入 PBS 液, 丙泊酚组细胞加入丙泊酚 30  $\mu\text{mol/L}$ , LPS 组细胞加入 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ , LPS+ 丙泊酚组细胞加入丙泊酚 30  $\mu\text{mol/L}$ +LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 。采用 MTT 比色实验测定细胞活性, 采用酶联免疫吸附法测定细胞上清液中白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, 采用逆转录-聚合酶链反应测定细胞 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 的表达, 采用 Western blot 检测细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量。**结果** LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞活性低于对照组和丙泊酚组 ( $P < 0.05$ ), LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞活性高于 LPS 组 ( $P < 0.05$ ); LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平高于对照组和丙泊酚组 ( $P < 0.05$ ), LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ ); LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK、TLR4 mRNA 和蛋白表达量高于对照组和丙泊酚组 ( $P < 0.05$ ), LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK、TLR4 mRNA 和蛋白表达量低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ ); 丙泊酚组和对照组小胶质细胞各指标比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** 丙泊酚能抑制小胶质细胞过度活化和炎症反应, 其机制可能与丙泊酚可下调 TLR4-p38MAPK 信号通路有关。

**关键词:** 丙泊酚; 小胶质细胞; 炎症因子。

**中图分类号:** R614

**文献标识码:** A

## Effect of Propofol on inflammatory cytokines in microglia and its mechanism\*

Xue-fei Ye<sup>1</sup>, Chun-long Zuo<sup>2</sup>, Hong-xia Mei<sup>2</sup>, Ying Su<sup>2</sup>, Jian-ping Yang<sup>1</sup>

(1. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China; 2. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Propofol on inflammatory cytokines in microglia and its mechanism. **Methods** Microglial BV-2 cells were divided into control group, Propofol group, lipopolysaccharide (LPS) group, and LPS+Propofol group. The cells of the control group were added with PBS. The cells of the Propofol group were added with 30  $\mu\text{mol/L}$  Propofol. The cells of the LPS group were treated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS. The cells of the LPS+Propofol group were added with 30  $\mu\text{mol/L}$  Propofol and 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS. The cell viability was determined by MTT colorimetric assay. The levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in supernatant were measured by ELISA. The expressions of p38MAPK and TLR4 mRNAs were detected by RT-PCR. The expressions of p38MAPK and TLR4 proteins were detected by Western blot. **Results** The activity of microglia

收稿日期: 2016-07-31

\* 基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (No: 2016KYA140)

in the LPS group and the LPS+Propofol group were lower than that in the control group and the Propofol group ( $P < 0.05$ ). The activity of microglia in the LPS+Propofol group was higher than that in the LPS group ( $P < 0.05$ ). The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the supernatant of the LPS group and the LPS+Propofol group were higher than those in the control group and the Propofol group ( $P < 0.05$ ). The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the supernatant of the LPS+Propofol group were lower than those in the LPS group ( $P < 0.05$ ). The mRNA and protein expressions of p38MAPK and TLR4 in the LPS group and the LPS+Propofol group were higher than those in the control group and the Propofol group ( $P < 0.05$ ). The mRNA and protein expressions of p38MAPK and TLR4 in the LPS+Propofol group were lower than those in the LPS group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the above indices between the Propofol group and the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Propofol has the effect of inhibiting the hyperactivity and inflammatory response of microglia, and its mechanism may be related to the down-regulation of TLR4-p38MAPK signaling pathway.

**Keywords:** Propofol; microglia; inflammatory factor

术后认知功能障碍表现为术后认知功能下降、行为障碍、语言缺失等,是老年人术后常见的并发症之一,使患者康复延迟,医疗费用和住院天数增加,病死率升高<sup>[1]</sup>。术后认知功能障碍的发生与炎症因子介导的神经炎症关系密切<sup>[2]</sup>,小胶质细胞活化诱导的炎症反应在术后认知功能障碍的发生中具有重要作用<sup>[3-4]</sup>。因此,防止小胶质细胞诱导的炎症反应对预防术后认知功能障碍具有重要意义。本文就丙泊酚对小胶质细胞炎症因子的影响进行研究,并探讨其可能机制,为临床治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

小胶质 BV-2 细胞(中国科学院基础医学细胞中心),丙泊酚、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)购自美国 Sigma 公司,MTT 试剂盒、PCR 试剂盒、小牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,兔抗鼠 p38MAPK 抗体、兔抗鼠 TLR4 抗体等购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 小胶质 BV-2 细胞培养** 将小胶质 BV-2 细胞接种到 DMEM 高糖培养基(含 100  $\mu$ /ml 链霉素、100  $\mu$ /ml 青霉素和 10% 新生牛血清)中培养,换液 1 次/48 h,2 ~ 3 d 传代 1 次,传代 2 次取生长良好的细胞用于实验研究。

**1.2.2 小胶质 BV-2 细胞分组** 将小胶质 BV-2 细胞分为对照组、丙泊酚组、LPS 组、LPS+ 丙泊酚组。对照组细胞加入 PBS 液,丙泊酚组细胞加入丙泊酚 30  $\mu$  mol/L, LPS 组细胞加入 LPS 1  $\mu$  g/ml, LPS+ 丙泊酚组细胞加入丙泊酚 30  $\mu$  mol/L+LPS 1  $\mu$  g/ml,每组取 8 个样本,培养 24 h。

**1.2.3 细胞活性测定** 将对数生长的细胞制成单细胞悬液,接种到 96 孔板(5  $\times$  10<sup>3</sup> 个细胞/孔)中培养,细胞贴壁后用无血清培养基培养 24 h,采用 MTT 比色实验测定 24 h 时各组小胶质 BV-2 细胞的活性,小胶质 BV-2 细胞活性(%) = 干预组 OD 值/对照组 OD 值  $\times$  100%。各组细胞干预后 24 h 取上清液,采用酶联免疫吸附法测定上清液中白细胞介素 1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平。

**1.2.4 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 表达量测定** 各组细胞干预 24 h 后,提取细胞总 RNA,以 GADPH 作为内参照,采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)测定各组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 的表达,PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 4 min,95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 60 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 42 个循环,72  $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min。每个样本设 8 个复孔,RT-PCR 结果以 CT 代表,以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  作为目的基因的相对表达量, $2^{-\Delta\Delta CT}$  = 各组小胶质 BV2 细胞目的基因表达量/对照组细胞目的基因表达量。

**1.2.5 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量测定** 各组细胞干预 24 h 后,采用 Western blot 检测各组细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量,用 Bradford 测定各组细胞总蛋白浓度,取 10  $\mu$ l 蛋白样品进行电泳,用脱脂奶粉封闭,分别加入 p38MAPK 和 TLR4 一抗孵育过夜,加入二抗孵育 2 h,加入 ECL 显色, X 线下曝光,采用 Quantity One 图像分析系统测定各组细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白的灰度值。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用方差分析,两两比较

用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小胶质细胞活性比较

对照组、丙泊酚组、LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞活性分别为  $(100.00 \pm 0.01)\%$ 、 $(103.24 \pm 1.57)\%$ 、 $(38.69 \pm 11.05)\%$  和  $(64.37 \pm 14.26)\%$ , 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 109.426$ ,  $P = 0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞活性均低于对照组和丙泊酚组 ( $P < 0.05$ ), LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞活性高于 LPS 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 各组小胶质细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量比较

对照组、丙泊酚组、LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平均高于对照组和丙泊酚组 ( $P < 0.05$ ), LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.3 各组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 表达量比较

对照组、丙泊酚组、LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 表达量均高于对照组和丙泊酚组 ( $P < 0.05$ ), LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 表达量低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.4 各组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量比较

对照组、丙泊酚组、LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, LPS 组和 LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量均高于对照组和丙泊酚组 ( $P < 0.05$ ), LPS+ 丙泊酚组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 1 各组小胶质细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量比较 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
对照组	43.26 $\pm$ 4.73	158.35 $\pm$ 8.79	182.32 $\pm$ 5.47
丙泊酚组	44.18 $\pm$ 5.02	163.24 $\pm$ 9.01	179.35 $\pm$ 5.38
LPS 组	176.48 $\pm$ 7.62 <sup>(1)2)</sup>	412.53 $\pm$ 15.47 <sup>(1)2)</sup>	532.14 $\pm$ 16.58 <sup>(1)2)</sup>
LPS+ 丙泊酚组	121.43 $\pm$ 6.37 <sup>(1)2)3)</sup>	297.58 $\pm$ 12.43 <sup>(1)2)3)</sup>	378.43 $\pm$ 13.24 <sup>(1)2)3)</sup>
F 值	218.647	995.463	1 170.324
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与丙泊酚组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$

表 2 各组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 mRNA 表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	p38MAPK mRNA	TLR4 mRNA
对照组	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.01
丙泊酚组	0.98 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.02
LPS 组	6.45 $\pm$ 0.76 <sup>(1)2)</sup>	6.87 $\pm$ 0.82 <sup>(1)2)</sup>
LPS+ 丙泊酚组	3.24 $\pm$ 0.47 <sup>(1)2)3)</sup>	3.54 $\pm$ 0.63 <sup>(1)2)3)</sup>
F 值	231.523	241.264
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与丙泊酚组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$

表 3 各组小胶质细胞 p38MAPK 和 TLR4 蛋白表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	p38MAPK 蛋白	TLR4 蛋白
对照组	0.26 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04
丙泊酚组	0.24 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.02
LPS 组	0.97 $\pm$ 0.12 <sup>(1)2)</sup>	1.32 $\pm$ 0.17 <sup>(1)2)</sup>
LPS+ 丙泊酚组	0.62 $\pm$ 0.08 <sup>(1)2)3)</sup>	0.82 $\pm$ 0.15 <sup>(1)2)3)</sup>
F 值	192.325	213.276
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与丙泊酚组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$

## 3 讨论

小胶质细胞占 10% ~ 20% 中枢神经系统细胞, 是中枢神经系统内主要的免疫效应细胞, 在炎症反应中发挥主导作用, 小胶质细胞为大脑的第一道防线, 具有保护大脑免受病原体入侵和损伤的作用<sup>[5-6]</sup>, 并可清除细胞碎片, 维持脑内稳态, 但过度、持续活化的

小胶质细胞分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等促炎因子,对神经元有损伤作用<sup>[7]</sup>,在中枢神经系统炎症损伤性疾病中具有重要作用。ZHOU 等<sup>[8]</sup>研究发现,大脑中动脉缺血再灌注可引起大脑区域梗死,小胶质细胞活化可释放大量炎症因子,在大脑中动脉缺血再灌注前给予丙泊酚可减少脑梗死面积,降低小胶质细胞释放的炎症因子水平。PEI 等<sup>[9]</sup>研究发现,LPS 可诱导外周血单核细胞产生 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO 等炎症因子的释放,丙泊酚可抑制外周血单核细胞释放炎症因子,具有抗炎作用。本研究结果发现,LPS 可降低小胶质细胞的活性,增加小胶质细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平,丙泊酚可增加 LPS 干预小胶质细胞活性,降低小胶质细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平,可见丙泊酚能降低小胶质细胞活性,降低活化小胶质细胞炎症因子水平,通过抗炎作用发挥对神经的保护作用。

TLR4 可介导小胶质细胞的活化,引起大量促炎因子的释放,从而损伤神经系统<sup>[10-11]</sup>。TLR4 激活后通过 2 种下游途径传递信号:髓样分化因子 88 依赖性通道和含 TIR 结构域受体介导的干扰素  $\beta$  通道。LU 等<sup>[12]</sup>研究发现,小鼠股骨骨折后出现认知功能下降,并伴有 TLR4/MyD88 升高。WANG 等<sup>[13]</sup>研究发现,大鼠脾切除术早期出现认知功能下降,并伴有 TLR4 水平升高,表达 TLR4 的小胶质细胞及炎症因子水平增加,表明小胶质细胞上 TLR4 信号激活可能是术后认知功能障碍的潜在机制。P38MAPK 是调节小胶质细胞释放促炎因子 TLR4 诱导的下游信号通路<sup>[14-15]</sup>。ZHOU 等<sup>[16]</sup>研究证实,丙泊酚可通过 TLR4/p38MAPK 信号通路,发挥对脊髓星形胶质细胞释放炎症因子的抑制作用。

综上所述,小胶质细胞受 LPS 干预后,p38MAPK、TLR4 mRNA 和蛋白表达量升高,丙泊酚可降低 LPS 干预后小胶质细胞 p38MAPK、TLR4 mRNA 和蛋白表达量。由此可见,丙泊酚对小胶质细胞炎症反应的抑制作用可能与丙泊酚下调 TLR4/p38MAPK 信号通路有关。

#### 参 考 文 献:

- [1] PANDHARIPANDE P P, GIRARD T D, ELY E W. Long-term cognitive impairment after critical illness[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(2): 185-186.
- [2] GAO Z X, RAO J, LI Y H. Hyperbaric oxygen preconditioning improves postoperative cognitive dysfunction by reducing oxidant stress and inflammation[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(2): 329-336.
- [3] ZHANG J, DENG X. Bupivacaine effectively relieves inflammation-induced pain by suppressing activation of the NF- $\kappa$ B signalling pathway and inhibiting the activation of spinal microglia and astrocytes[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(3): 1074-1080.
- [4] ROTHE T, IPSEIZ N, FAAS M, et al. The Nuclear receptor Nr4a1 acts as a microglia rheostat and serves as a therapeutic target in autoimmune-driven central nervous system inflammation[J]. *J Immunol*, 2017, 198(10): 3878-3885.
- [5] KLEINBERGER G, BRENDEL M, MRACSKO E, et al. The FTD-like syndrome causing TREM2 T66M mutation impairs microglia function, brain perfusion, and glucose metabolism[J]. *EMBO J*, 2017, 36(13): 1837-1853.
- [6] KWON Y H, KIM J, KIM C S, et al. Hypothalamic lipid-laden astrocytes induce microglia migration and activation[J]. *FEBS Lett*, 2017, 591(12): 1742-1751.
- [7] CAO L, HE C. Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination[J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(2): 189-198.
- [8] ZHOU R, YANG Z, TANG X, et al. Propofol protects against focal cerebral ischemia via inhibition of microglia-mediated proinflammatory cytokines in a rat model of experimental stroke[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82729.
- [9] PEI Z, WANG J. Propofol attenuates LPS-induced tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and nitric oxide expression in canine peripheral blood mononuclear cells possibly through down-regulation of nuclear factor (NF) - $\kappa$ B activation[J]. *J Vet Med Sci*, 2015, 77(2): 139-145.
- [10] 李艳花, 杨兴旺, 张辉, 等. Fasudil 通过 TLR4 通路抑制脂多糖诱导的小鼠 BV-2 小胶质细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(1): 11-14.
- [11] 宿明艳, 钱燕宁. Toll 样受体 4 在小胶质细胞炎症反应中的作用与认知功能的关系 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2013, 34(9): 840-842, 864.
- [12] LU S M, YU C J, LIU Y H, et al. S100A8 contributes to postoperative cognitive dysfunction in mice undergoing tibial fracture surgery by activating the TLR4/MyD88 pathway[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 44(27): 221-234.
- [13] WANG Y, HE H, LI D, et al. The role of the TLR4 signaling pathway in cognitive deficits following surgery in aged rats[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4): 1137-1142.
- [14] 胡兴国, 阳红艳, 文锬, 等. 脊髓 TLR4/p38MAPK 级联活化介导持续性术后痛时 TNF- $\alpha$  的增加 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2016, 22(1): 23-27.
- [15] 胡兴国, 阳红艳, 文锬, 等. 脊髓胶质细胞 p38 有丝分裂原活化蛋白激酶在大鼠持续性术后痛形成中的作用: 与 Toll 样受体 4 的关系 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(5): 574-577.
- [16] ZHOU C H, ZHU Y Z, ZHAO P P, et al. Propofol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in spinal astrocytes via the toll-like receptor 4/myd88-dependent nuclear factor- $\kappa$ B, extracellular signal-regulated protein kinases1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Anesth Analg*, 2015, 120(6): 1361-1368.

(童颖丹 编辑)