

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.01.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 01-0038-07

实验研究·论著

基于HIF-1 α /ERK通路探讨异丙酚对缺氧大鼠 海马神经元线粒体损伤的影响*

妙永惠¹, 阎文军²

(1. 临夏州人民医院 麻醉科, 甘肃 临夏 731100; 2. 甘肃省人民医院 麻醉科,
甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 观察异丙酚通过缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/细胞外调节激酶(ERK)通路对缺氧大鼠海马神经元线粒体损伤的影响。**方法** 新生SD大鼠离体培养原代海马神经元细胞, 随机分为6组。对照组(高糖DMEM培养液)、缺氧组(低糖DMEM培养液)、LP组(3 mg/L异丙酚的低糖DMEM培养液)、MP组(6 mg/L异丙酚的低糖DMEM培养液)、HP组(12 mg/L异丙酚的低糖DMEM培养液)及U0126组(终浓度12 mg/L异丙酚+50 μ mol/L U0126的低糖DMEM培养液)。缺氧组、LP组、MP组、HP组及U0126组于缺氧条件培养24 h; 对照组于有氧条件培养24 h。透射电镜观察各组海马神经元细胞形态; MTT法检测细胞存活率; 激光共聚焦显微镜检测Ca²⁺、活性氧(ROS)的荧光强度; 酶联免疫吸附试验检测细胞钙调神经磷酸酶(GaN)活性; Western blotting检测HIF-1 α 、ERK1/2、p-ERK1/2、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)蛋白表达。**结果** 缺氧组线粒体损伤严重, LP、MP和HP组线粒体损伤均有所减轻, HP组减轻最为明显, U0126组线粒体损伤较HP组严重。与缺氧组海马神经元细胞存活率(42.30 \pm 3.64)%比较, MP组(59.54 \pm 5.19)%、HP组(70.81 \pm 6.47)%及U0126组(53.08 \pm 5.61)%均升高, 且HP组高于MP组和U0126组($P < 0.05$)。与缺氧组Ca²⁺、ROS荧光强度[(0.107 \pm 0.004)、(0.087 \pm 0.003)]比较, LP组ROS荧光强度(0.078 \pm 0.003)及MP组、HP组及U0126组Ca²⁺荧光强度[(0.085 \pm 0.003)、(0.067 \pm 0.002)、(0.090 \pm 0.003)]、ROS荧光强度[(0.060 \pm 0.002)、(0.051 \pm 0.005)、(0.076 \pm 0.003)]均降低($P < 0.05$), HP组低于MP组和U0126组($P < 0.05$)。与缺氧组GaN活性(0.61 \pm 0.05) u/mg比较, MP组、HP组及U0126组[(0.50 \pm 0.05) u/mg、(0.37 \pm 0.04) u/mg、(0.54 \pm 0.04) u/mg]降低, 且HP组低于MP组和U0126组($P < 0.05$)。与缺氧组比较, LP组、MP组、HP组及U0126组HIF-1 α 、p-ERK1/2蛋白相对表达量升高, 且HP组高于LP组、MP组和U0126组($P < 0.05$); 与缺氧组比较, LP组、MP组、HP组及U0126组Caspase-3蛋白相对表达量降低, 且HP组低于LP组、MP组和U0126组($P < 0.05$)。**结论** 异丙酚可减轻缺氧大鼠海马神经元线粒体损伤, 其调控机制可能与HIF-1 α /ERK通路有关。

关键词: 缺氧; 异丙酚; 海马神经元; 线粒体损伤; 缺氧诱导因子-1 α ; 细胞外调节激酶

中图分类号: R743.3; R971.2

文献标识码: A

Effect of propofol on mitochondrial damage of hippocampal neurons in hypoxic rats based on HIF-1 α /ERK pathway*

Miao Yong-hui¹, Yan Wen-jun²

(1. Department of Anesthesiology, The People's Hospital of Linxia, Linxia, Gansu 731100, China;

2. Department of Anesthesiology, Gansu Provincial People's Hospital,
Lanzhou, Gansu 730000, China)

收稿日期: 2022-04-13

* 基金项目: 甘肃省自然科学基金(No: 20JR5RA146)

Abstract: Objective To observe the effect of propofol on the mitochondrial damage of hippocampal neurons in hypoxic rats through the hypoxia-inducible factor-1 α /extracellular regulatory kinase (HIF-1 α /ERK) pathway. **Method** Newborn SD rats were cultured in vitro with primary hippocampal neurons and randomly divided into 6 groups, hypoxia group (low glucose DMEM medium), LP group, MP group, HP group (final concentrations of 3, 6, 12 mg/L, respectively) propofol low-sugar DMEM culture medium), and U0126 group (final concentration of 12 mg/L propofol + 50 μ mol/L U0126 low-sugar DMEM culture medium), cultured under hypoxia for 24 hours. The control group (high-sugar DMEM medium) was cultured for 24 hours under aerobic conditions. The morphology of hippocampal neurons in each group was observed by transmission electron microscope. Cell survival rate was detected by MTT method. Ca²⁺ and reactive oxygen species (ROS) content were detected by laser confocal microscope. The activity of calcineurin (CaN) in cells was detected by ELISA. The protein expressions of HIF-1 α , ERK1/2, p-ERK1/2, and aspartate specific cysteine protease 3 (Caspase-3) were detected by Western blotting. **Results** The mitochondrial damage in the hypoxia group was severe, and the mitochondrial damage in the LP, MP, and HP groups were all reduced. The HP group had the most significant reduction. The U0126 group had more severe mitochondrial damage than the HP group. Compared with the hippocampal neuron survival rate (42.30 \pm 3.64)% in the hypoxia group, the MP group (59.54 \pm 5.19) %, the HP group (70.81 \pm 6.47) %, and the U0126 group (53.08 \pm 5.61) % all increased, and the HP group Higher than MP group and U0126 group ($P < 0.05$). Compared with the fluorescence intensity of Ca²⁺ and ROS [(0.107 \pm 0.004), (0.087 \pm 0.003)] in the hypoxia group, the fluorescence intensity of ROS in the LP group (0.078 \pm 0.003) and the Ca²⁺ fluorescence intensity in the MP, HP, and U0126 groups [(0.085 \pm 0.003), (0.067 \pm 0.002), (0.090 \pm 0.003)], ROS fluorescence intensity [(0.060 \pm 0.002), (0.051 \pm 0.005), (0.076 \pm 0.003)] all decreased ($P < 0.05$), and the HP group was lower than MP group and U0126 group ($P < 0.05$). Compared with the CaN activity (0.61 \pm 0.05) U/mg in the hypoxia group, the MP group, HP group, and U0126 group [(0.50 \pm 0.05) U/mg, (0.37 \pm 0.04) U/mg, (0.54 \pm 0.04) U/mg] decreased, and HP group was lower than MP group and U0126 group ($P < 0.05$). Compared with the hypoxia group, the relative expression of HIF-1 α and p-ERK1/2 protein in the LP group, MP group, HP group, and U0126 group increased, and the HP group was higher than the LP group, MP group, and U0126 group ($P < 0.05$); Compared with the hypoxia group, the relative expression of Caspase-3 protein in the LP, MP, HP, and U0126 groups decreased, and the HP group was lower than the LP, MP, and U0126 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Propofol can reduce mitochondrial damage of hippocampal neurons in hypoxic rats, and its regulatory mechanism may be related to the HIF-1 α /ERK pathway.

Keywords: hypoxia; propofol; hippocampal neurons; mitochondrial damage; hypoxia-inducible factor-1 α ; extracellular regulated kinase

脑缺血性疾病属于发病率、致死率和致残率高的临床常见疾病,严重威胁患者生命安全^[1]。海马神经元对缺氧反应十分敏感,线粒体损伤是神经元缺氧损伤的关键环节,探讨海马神经元缺氧损伤机制有重要的临床意义^[2]。近年来,麻醉药的脑保护作用逐渐成为研究热点。异丙酚对脏器保护及缺血再灌注损伤影响的研究已有报道^[3-4]。既往研究显示^[5],异丙酚具有减轻脑缺血再灌注损伤的保护作用,但其对线粒体损伤的影响及具体机制尚无定论。本研究通过体外培养大鼠原代海马神经元,并应用糖氧剥夺法复制海马神经元缺氧损伤模型,旨在观察不同剂量异丙酚对缺氧海马神经元线粒体损伤的作用,并探讨其可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体(SPF)级新生SD大鼠(24 h内)2只,性别不限,体重(8 \pm 2)g,健康(皮肤黏膜红润,运动正常),购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(甘)2018-005]。

1.2 主要试剂与仪器

异丙酚(英国阿斯利康制药有限公司,批准文号:H20130535),缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)/细胞外调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)特异性抑制剂U0126(武汉艾美捷科技有限公司),DMEM-F12

培养液、Neurobasal-A 培养液(美国 HyClone 公司),多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司),钙调神经磷酸酶(Calcineurin, GaN)检测试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),钙离子荧光探针(FLuo-AM)、聚乳酸聚合物(Pluronic F127)(海门市碧云天生物技术研究所),2,7-二氯荧光素二乙酸酯探针(2,7-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)(北京百奥莱博科技有限公司),兔抗大鼠 HIF-1 α 、ERK1/2、磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(cysteine-containing aspartate-specific proteases 3, Caspase-3)多抗(一抗)及辣根或氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 单抗(二抗)(美国 Abcam 公司)。QP-80 型三气培养箱(美国 Thermo 公司),CKX53 型倒置光学显微镜、FV3000 型激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯株式会社),Infinite F50 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司),Mini-PROTEAN Tetra 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 原代海马神经元分离和培养 新生 SD 大鼠断头处死,无菌取海马组织,置于 DMEM-F12 培养液(20% 胎牛血清),更换 0.25% 胰蛋白酶消化处理 25 min,吸管吹打均匀,加入 DMEM-F12 培养液终止消化,消化液过 200 目滤网,滤液经 1 000 r/min 离心 5 min,取沉淀,DMEM-F12 培养液重悬。调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,培养于多聚赖氨酸包被的培养皿中,95% O₂、5% CO₂、37℃ 及饱和湿度条件下,培养 24 h 后替换 Neurabasal-A 培养液(2% B27+1% L-谷氨酰胺+1% 丙酮酸钠),倒置显微镜下观察细胞生长情况,培养至第 3 天加入 4 mg/L 的阿糖胞苷抑制非神经细胞过度增殖,每 3 天半量换液 1 次,倒置显微镜观察细胞形态,培养至第 8 天采用免疫细胞化学染色法观察神经元特异性烯醇化酶表达,细胞浆和突起棕褐色阳性染色细胞即为海马神经元细胞,阳性细胞占总细胞数 92% 以上即可用于后续实验^[6]。

1.3.2 分组及干预方法 培养至第 8 天原代海马神经元细胞分为 6 组,每组 3 个复孔。对照组:用高糖 DMEM 培养液替换 Neurabasal-A 培养液;缺氧组:用低糖 DMEM 培养液替换 Neurabasal-A 培养液;低剂量异丙酚组(LP 组)、中剂量异丙酚组(MP 组)和

高剂量异丙酚组(HP 组):用含终浓度分别为 3 mg/L、6 mg/L、12 mg/L 异丙酚的低糖 DMEM 培养液替换 Neurabasal-A 培养液;U0126 组:用含终浓度 12 mg/L 异丙酚+50 μ mol/L U0126 的低糖 DMEM 培养液替换 Neurabasal-A 培养液。对照组细胞于 95% O₂、5% CO₂、37℃ 及饱和湿度条件培养 24 h;缺氧组、LP 组、MP 组、HP 组和 U0126 组细胞于 95% N₂、5% CO₂、37℃ 及饱和湿度条件培养 24 h。

1.3.3 透射电镜观察海马神经元细胞形态 收集干预 24 h 后的各组细胞,PBS 吹洗 3 次后,加入胰蛋白酶消化获得细胞沉淀,加入 20 倍沉淀体积的固定液于 4℃ 固定 48 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后,参照文献[7]制作厚度为 50 nm 超薄切片,经醋酸双氧铀双面染色后,于透射电镜下观察细胞超微结构,并拍摄照片。

1.3.4 MTT 法检测细胞存活率 收集干预 24 h 后的各组细胞,分别加入 0.5 g/L MTT 溶液,继续培养 3 h,加入 20% 的十二烷基磺酸钠溶液,充分混匀溶解结晶,应用酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度值。计算细胞存活率=各干预组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

1.3.5 激光共聚焦显微镜检测 Ca²⁺、活性氧(ROS)的荧光强度 原代海马神经元细胞培养于加有载玻片的 24 孔板,按照上述缺氧和干预方法处理 24 h,Hank's 液洗涤 3 次。每孔加入 5 μ mol/L FLuo-AM 和质量浓度 0.05% Pluronic F127 混合液(Ca²⁺荧光强度检测),或每孔加入 10 μ mol/L DCFH-DA 探针(ROS 荧光强度检测)。37℃ 避光孵育 30 min,Hank's 液洗涤 3 次,并用 Hank's 液继续避光孵育 30 min,然后用 4% 多聚甲醛固定、封片,激光共聚焦显微镜(激发波 488 nm、发射波 525 nm)观察拍照,应用 Image J 图像分析软件分析荧光强度。

1.3.6 酶联免疫吸附试验检测细胞 GaN 活性 收集干预 24 h 后的各组细胞,PBS 洗涤并重悬细胞,加入细胞裂解液于冰上裂解 20 min,12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 12 cm),取上清液,BCA 法检测蛋白浓度,按照 GaN 检测试剂盒说明书步骤操作,检测细胞 GaN 活性。

1.3.7 Western blotting 检测细胞的 HIF-1 α 、ERK1/2、p-ERK1/2、Caspase-3 蛋白相对表达量 收集干预 24 h 后的各组细胞,PBS 洗涤并重悬细胞,加入细胞

裂解液于冰上裂解 20 min, 12 000 r/min 离心 15 min (离心半径 12 cm), 取上清液, 于沸水水浴 10 min 变性, 再次离心取上清液, BCA 法检测蛋白浓度。取 50 μ g 待测蛋白进行恒定电流的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳约 1.5 h, 分离胶电转至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入稀释一抗 HIF-1 α (1:400)、ERK1/2、p-ERK1/2、Caspase-3 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 含 Tris-HCl 的吐温 20 缓冲液 (TBST) 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入稀释二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, TBST 再次洗涤, 加入电化学发光液显色, 以 β -actin 为内参, 蛋白条带应用 Image J 图像分析软件分析目的蛋白相对表达量。

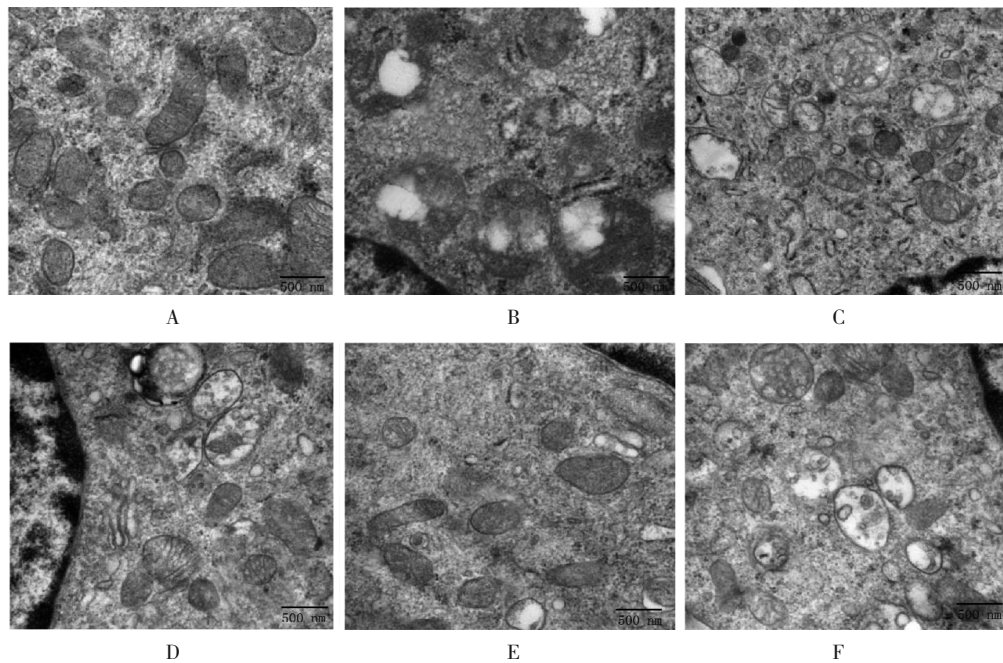
1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组海马神经元形态改变

对照组线粒体膜和嵴结构完整清晰, 数量多; 缺氧组线粒体数量少且肿胀, 嵴完整性和连续性破坏, 空泡化严重; LP 组、MP 组和 HP 组线粒体上述损伤均有所减轻, 其中 HP 组减轻最为明显; U0126 组线粒体损伤较 HP 组严重。见图 1。



A: 对照组; B: 缺氧组; C: LP 组; D: MP 组; E: HP 组; F: U0126 组。

图1 各组海马神经元线粒体超微结构 (透射电镜 $\times 15\ 000$)

2.2 各组海马神经元细胞存活率的比较

各组海马神经元细胞存活率分别为: 对照组 (95.65 \pm 4.20)%、缺氧组 (42.30 \pm 3.64)%、LP 组 (45.41 \pm 4.22)%、MP 组 (59.54 \pm 5.19)%、HP 组 (70.81 \pm 6.47)%、U0126 组 (53.08 \pm 5.61)%, 各组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=174.790$, $P=0.000$); 进一步两两比较, 结果: 与对照组比较, 缺氧组海马神经元细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 与缺氧组比较, MP 组、HP 组及 U0126 组海马神经元细胞存活率升高, 且 HP 组高于 MP 组和 U0126 组

($P < 0.05$); 缺氧组与 LP 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组海马神经元 Ca^{2+} 、ROS 荧光强度的比较

各组海马神经元 Ca^{2+} 、ROS 荧光强度比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=155.230$ 和 224.164 , 均 $P=0.000$); 进一步两两比较, 与对照组比较, 缺氧组海马神经元 Ca^{2+} 、ROS 荧光强度均升高 ($P < 0.05$); 与缺氧组比较, LP 组 ROS 荧光强度降低 ($P < 0.05$), Ca^{2+} 荧光强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与缺氧组比较, MP 组、HP 组及 U0126 组海马

神经元 Ca^{2+} 、ROS 荧光强度均降低，且 HP 组低于 MP 组和 U0126 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组海马神经元细胞 Ca^{2+} 、ROS 荧光强度的比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	Ca^{2+} 荧光强度	ROS 荧光强度
对照组	0.053 ± 0.002	0.019 ± 0.002
缺氧组	0.107 ± 0.004 ^①	0.087 ± 0.003 ^①
LP 组	0.102 ± 0.003	0.078 ± 0.003 ^②
MP 组	0.085 ± 0.003 ^{②③}	0.060 ± 0.002 ^{②③}
HP 组	0.067 ± 0.002 ^{②③④}	0.051 ± 0.005 ^{②③④}
U0126 组	0.090 ± 0.003 ^{②⑤}	0.076 ± 0.003 ^{②⑤}
F 值	155.230	224.164
P 值	0.000	0.000

注：①与对照组比较， $P < 0.05$ ；②与缺氧组比较， $P < 0.05$ ；③与 LP 组比较， $P < 0.05$ ；④与 MP 组比较， $P < 0.05$ ；⑤与 HP 组比较， $P < 0.05$ 。

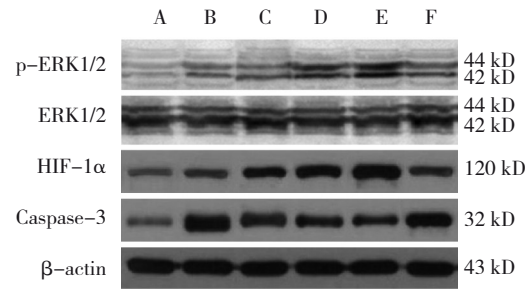
2.4 各组海马神经元细胞 GaN 活性的比较

各组海马神经元细胞 GaN 活性分别为：对照组 (0.23 ± 0.02) u/mg、缺氧组 (0.61 ± 0.05) u/mg、LP 组 (0.59 ± 0.06) u/mg、MP 组 (0.50 ± 0.05) u/mg、HP 组 (0.37 ± 0.04) u/mg、U0126 组 (0.54 ± 0.04) u/mg，各组海马神经元细胞 GaN 活性比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($F = 123.120, P = 0.000$)；进一步两两比较，与对照组比较，缺氧组海马神经元 GaN 活性升高 ($P < 0.05$)；与缺氧组比较，MP 组、HP 组及 U0126 组海马神经元 GaN 活性降低，且 HP 组低于 MP 组和 U0126 组 ($P < 0.05$)；缺氧组与 LP 组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组海马神经元细胞 HIF-1 α 、ERK1/2、p-ERK1/2、Caspase-3 蛋白相对表达量比较

各组海马神经元细胞 HIF-1 α 、p-ERK1/2、Caspase-3 蛋白相对表达量比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，各组 ERK1/2 蛋白相对表达量比较，经方差分析，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；进一步两两比较，与对照组比较，缺氧组 HIF-1 α 、p-ERK1/2、Caspase-3 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)；与缺氧组比较，LP 组、MP 组、HP 组及 U0126 组 HIF-1 α 、p-ERK1/2 蛋白相对表达量升高，且 HP 组高于 LP 组、MP 组和 U0126 组 ($P < 0.05$)；与缺氧组比较，LP 组、MP 组、HP 组及 U0126 组 Caspase-3 蛋白相对表达量降低，且 HP 组低于 LP

组、MP 组和 U0126 组 ($P < 0.05$)；缺氧组与 LP 组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2 和表 2。



A: 对照组; B: 缺氧组; C: LP 组; D: MP 组; E: HP 组; F: U0126 组。

图 2 各组海马神经元细胞 HIF-1 α 、ERK1/2、p-ERK1/2、Caspase-3 蛋白表达

表 2 各组海马神经元细胞 HIF-1 α 、ERK1/2、p-ERK1/2、Caspase-3 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α	ERK1/2	p-ERK1/2	Caspase-3
对照组	0.20 ± 0.03	0.98 ± 0.08	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.04
缺氧组	0.37 ± 0.04 ^①	0.99 ± 0.09	0.45 ± 0.04 ^①	1.20 ± 0.09 ^①
LP 组	0.87 ± 0.06 ^②	0.97 ± 0.07	0.51 ± 0.04 ^②	0.95 ± 0.08 ^②
MP 组	0.99 ± 0.07 ^{②③}	0.92 ± 0.09	0.75 ± 0.03 ^{②③}	0.71 ± 0.07 ^{②③}
HP 组	1.11 ± 0.07 ^{②③④}	1.02 ± 0.08	0.96 ± 0.08 ^{②③④}	0.52 ± 0.06 ^{②③④}
U0126 组	0.56 ± 0.06 ^{②⑤}	1.01 ± 0.07	0.62 ± 0.07 ^{②⑤}	1.01 ± 0.08 ^{②⑤}
F 值	223.190	1.674	67.144	145.012
P 值	0.000	0.156	0.000	0.000

注：①与对照组比较， $P < 0.05$ ；②与缺氧组比较， $P < 0.05$ ；③与 LP 组比较， $P < 0.05$ ；④与 MP 组比较， $P < 0.05$ ；⑤与 HP 组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

脑组织对缺氧十分敏感，尤其是海马神经元，短时间的缺氧即可造成不可逆损伤，其机制十分复杂，目前仍未完全阐明^[8-9]。研究认为，氧化应激、胞内钙超载是神经元缺氧损伤的重要机制，脑组织缺氧后，突触过度激活引起 Ca^{2+} 通道开放，细胞外 Ca^{2+} 大量内流，同时自由基大量生成，导致线粒体膜去极化发生结构改变^[10]。进一步促使 Ca^{2+} 通道开放，胞内钙超载，加重神经元损伤。胞内钙超载导致的线粒体损伤可加速神经元凋亡，目前该机制已成为研究的热点领域^[11-13]。目前关于异丙酚对缺氧海马神经元线粒体损伤的影响及具体机制仍需深入研究，为其临床应用提供理论支持。

本研究结果显示，缺氧组海马神经元存活率

低于对照组,细胞内线粒体超微结构损伤严重, Ca²⁺、ROS荧光强度、GaN活性高于对照组,说明缺氧可导致细胞外Ca²⁺大量内流,造成海马神经元线粒体损伤,最终引起海马神经元死亡。本研究进一步应用不同浓度异丙酚作用于体外培养海马神经元,结果发现,MP组、HP组线粒体损伤减轻,且细胞存活率高于缺氧组, Ca²⁺、ROS荧光强度、GaN活性均低于缺氧组,提示异丙酚具有减少海马神经元钙超载,清除自由基,缓解胞内线粒体损伤的作用。研究表明,异丙酚可激活 γ -氨基丁酸A型(GABA_A)受体,可以选择性地让Cl⁻通过,引起细胞膜超极化, Ca²⁺内流^[14]。另有研究表明,异丙酚可通过抑制N-甲基-D-天冬氨酸受体毒性,变构调节门控通道,发挥细胞保护作用^[15]。动物实验研究显示^[16],丙泊酚可有效缓解七氟烷诱导的大鼠海马神经细胞损伤,抑制炎症反应和神经元凋亡,从而发挥认知损伤保护作用。XU等^[17]的研究显示,低浓度丙泊酚可增强海马神经元活力,抑制其凋亡,与本研究结果相似,但在其研究中高浓度丙泊酚可降低海马神经元活力,促进其凋亡,可能与p38丝裂原活化蛋白激酶磷酸化水平有关,这与本研究结果不一致,其原因可能为本研究选用的细胞糖氧剥夺模型而使研究结果差异。

本研究发现,缺氧组HIF-1 α 、p-ERK1/2、Caspase-3蛋白相对表达量均高于对照组,不同浓度异丙酚干预后上述蛋白表达量降低,提示丙泊酚抑制细胞内线粒体损伤的作用可能与抑制HIF-1 α /ERK信号通路激活有关。HIF-1 α /ERK是细胞缺氧损伤相关的关键信号通路之一。HIF-1 α 属于细胞内具有转录活性的核蛋白,缺氧条件下大量表达调控多种基因转录和翻译,以适应缺氧环境^[18]。ERK1/2磷酸化水平与缺氧及细胞凋亡关系密切,可直接影响HIF-1 α 转录活性,同时可调控下游凋亡关键蛋白酶Caspase-3的表达^[19-20]。本研究在高剂量异丙酚基础上应用HIF-1 α /ERK信号通路抑制剂U0126干预,结果显示,与HP组比较,U0126组线粒体损伤程度较重,细胞存活率降低, Ca²⁺、ROS荧光强度及GaN活性升高,且HIF-1 α 、p-ERK1/2蛋白相对表达量降低,Caspase-3蛋白表达量升高,进一步说明异丙酚可通过激活HIF-1 α /ERK信号通路发挥减轻大鼠海马神经元线粒体损伤的作用。

综上所述,不同浓度异丙酚作用于体外培养海马神经元可减少细胞内Ca²⁺、ROS荧光强度,抑制GaN活性,减轻缺氧大鼠海马神经元线粒体损伤,其调控机制可能与HIF-1 α /ERK信号通路有关。海马神经元糖氧剥夺损伤是多种分子机制共同作用的结果,线粒体损伤导致的能量代谢异常是导致细胞凋亡的主要原因之一,其机制也存在复杂性。本研究仅从HIF-1 α /ERK信号通路分析了异丙酚对线粒体损伤影响的机制,后续研究重点将探讨异丙酚能否通过其他途径影响神经元线粒体损伤,为临床提供更多的理论依据。

参 考 文 献 :

- [1] KHANEVSKI A N, BJERKREIM A T, NOVOTNY V, et al. Recurrent ischemic stroke: incidence, predictors, and impact on mortality[J]. *Acta Neurol Scand*, 2019, 140(1): 3-8.
- [2] QUINTANILLA R A, PÉREZ M J, ARANGUIZ A, et al. Activation of the melanocortin-4 receptor prevents oxidative damage and mitochondrial dysfunction in cultured hippocampal neurons exposed to ethanol[J]. *Neurotox Res*, 2020, 38(2): 421-433.
- [3] 刘云霞,于洪丽,朱敏,等. TRPM2-CnA-Drp1通路在丙泊酚减轻小鼠肝缺血再灌注致肾损伤中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2021, 41(6): 680-684.
- [4] 徐艺,张颖,肖骏,等. 丙泊酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(16): 2184-2186.
- [5] CHEN W, JU X Z, LU Y, et al. Propofol improved hypoxia-impaired integrity of blood-brain barrier via modulating the expression and phosphorylation of zonula occludens-1[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(6): 704-713.
- [6] 仁德芳,付裕,王洪连,等. 乳鼠海马神经元的分离和原代培养[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(5): 660-663.
- [7] 黄远洁. 石蜡切片组织透射电镜样品制备方法的比较分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2019, 35(2): 234-235.
- [8] 周丽娟,杨朴,郑道都,等. 秋水仙素对脑胶质瘤细胞体外抑制和对海马神经元细胞缺氧/复氧保护作用的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(8): 936-940.
- [9] CHEN Y, WEN J Y, CHEN Z W. H₂S protects hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury by promoting RhoA phosphorylation at Ser188[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 132.
- [10] CALVO-RODRIGUEZ M, HERNANDO-PÉREZ E, LÓPEZ-VÁZQUEZ S, et al. Remodeling of intracellular Ca²⁺ homeostasis in rat hippocampal neurons aged *in vitro*[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1549.
- [11] HELD R G, LIU C L, MA K P, et al. Synapse and active Zone assembly in the absence of presynaptic Ca²⁺ channels and Ca²⁺ entry[J]. *Neuron*, 2020, 107(4): 667-683.e9.
- [12] 王蕾,张雄,陈赵乐,等. 白果内酯对糖氧剥夺小鼠原代海马神

- 经元内钙离子浓度的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2020, 36(1): 40-44.
- [13] GIESEN J, FÜCHTBAUER E M, FÜCHTBAUER A, et al. AMPA induces NO-dependent cGMP signals in hippocampal and cortical neurons via L-type voltage-gated calcium channels[J]. *Cereb Cortex*, 2020, 30(4): 2128-2143.
- [14] WANG B F, LV K, LIU H F, et al. Contribution of the $\alpha 5$ GABA_A receptor to the discriminative stimulus effects of propofol in rat[J]. *Neuroreport*, 2018, 29(5): 347-352.
- [15] SATO M, YASUMOTO H, ARAI T. General anesthesia with propofol for ovarian teratoma excision associated with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis[J]. *JA Clin Rep*, 2018, 4(1): 14.
- [16] 肖秀英, 吴华兵, 詹玮玮. 丙泊酚对七氟烷引起的大鼠海马神经细胞凋亡及认知障碍的影响及相关机制探究[J]. *解放军医药杂志*, 2021, 33(2): 10-13.
- [17] XU X D, WU G H, LIU Y, et al. Effects of propofol on hippocampal neuron viability[J]. *Childs Nerv Syst*, 2020, 36(9): 1995-2002.
- [18] 张艳丽, 万凤, 田沫, 等. 黄芪甲苷上调 HIF-1 α 表达促进氧糖剥夺/再灌注胚鼠海马神经干细胞增殖和分化的作用[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(7): 3358-3362.
- [19] 季中华, 王丽萍, 王世英, 等. 盐酸右旋美托咪啶通过提高 HIF-1 α 的表达减轻糖尿病大鼠肾缺血再灌注损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(8): 944-949.
- [20] 杜娜, 戴红良, 贾桂枝. ERK/CT-1 通路对氧化应激致 H9C2 细胞凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(9): 11-15.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 妙永惠, 阎文军. 基于 HIF-1 α /ERK 通路探讨异丙酚对缺氧大鼠海马神经元线粒体损伤的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(1): 38-44.

Cite this article as: MIAO Y H, YAN W J. Effect of propofol on mitochondrial damage of hippocampal neurons in hypoxic rats based on HIF-1 α /ERK pathway[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(1): 38-44.