

引用本文:代娟,张敏.右美托咪定在体外对原代海马神经元氧化应激损伤的影响[J].安徽医药,2021,25(11):2170-2173.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.11.011.



◇ 药学研究 ◇

右美托咪定在体外对原代海马神经元氧化应激损伤的影响

代娟¹,张敏²

作者单位:¹重庆市涪陵中心医院麻醉科,重庆408000;

²内江市第二人民医院麻醉科,四川 内江641000

摘要: **目的** 探讨右美托咪定在体外减弱原代海马神经元的氧化应激损伤的机制。**方法** 将培养的原代海马神经元分为5组:空白对照组(C组)、损伤对照组(S组)、右美托咪定组(D组),D₁、D₂、D₃组加入不同剂量的右美托咪定(0.001 μmol/L、0.1 μmol/L、10 μmol/L)。利用1 mmol/L的过氧化氢(H₂O₂)处理原代海马神经元1 h,制作神经元氧化应激损伤模型。按照以上分组情况加入右美托咪定,37℃、5%二氧化碳孵箱孵育6 h。通过测定细胞存活率和上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性确定减轻海马神经元损伤的右美托咪定的适宜浓度。并检测细胞内丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化。应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法测量各组细胞外信号调节激酶(ERK)1/2和脑源性神经营养因子(BDNF) mRNA表达量。**结果** 右美托咪定组(0.001 μmol/L、0.1 μmol/L、10 μmol/L)细胞存活率分别为(72.13±2.45)%、(89.34±2.56)%、(78.40±2.60)%,均高于损伤组的(51.04±2.12)%,差异有统计学意义($P<0.05$);LDH活性显著低于损伤对照组;0.1 μmol/L右美托咪定组对海马神经细胞氧化应激损伤的保护作用最好。0.1 μmol/L右美托咪定组海马神经细胞培养上清液中MDA含量及细胞凋亡率显著低于损伤对照组,SOD活性显著高于损伤对照组。RT-PCR法检测结果提示0.1 μmol/L右美托咪定组ERK1/2和BDNF mRNA表达量显著高于损伤对照组。**结论** 适宜剂量的右美托咪定对氧化应激损伤的海马神经元有一定的保护作用,其作用机制可能与其能够提升海马神经细胞的抗氧化能力,从而抑制海马神经元的凋亡有关,这种功能可能与ERK1/2和BDNF信号通路有关。

关键词: 右美托咪定; 氧化应激; 海马神经元; 细胞外信号调节激酶1/2; 脑源性神经营养因子

Protective effect of dexmedetomidine against oxidative damage of rat hippocampal neurons and it's mechanism

DAI Juan¹,ZHANG Min²

Author Affiliations:¹Department of Anesthesiology,Fuling Central Hospital,Chongqing 408000,China;

²Department of Anesthesiology,The Second Peoples Hospital of Neijiang,Neijiang 641000,China

Abstract: **Objective** To observe the protective effect of dexmedetomidine against oxidative damage of rat hippocampal neurons and discuss its mechanism.**Methods** The hippocampal neurons were divided into 5 groups:control group, injury group,and 3 different doses of dexmedetomidine groups(0.001 μmol/L,0.1 μmol/L,10 μmol/L).Oxidative stress model was established by incubating hippocampal neurons with H₂O₂(1 mmol/L)for 1 hour. Different levels of dexmedetomidine were added to oxidative damaged neurons and then these neurons were cultured in incubator for 6 hours.To selecte the most fittest concentration of dexmedetomidine by testing viability of neurons and activity of LDH.Then MDA concentration and SOD activity were (checked) measured.Tae expression of apoptosis factors including ERK1/2 and BDNF was detected by Real—time fluorescent quantitative PCR.**Results** Cell survival in the dextrotoprimidine group (0.001 μmol/L, 0.1 μmol/L, 10 μmol/L) was (72.13 ± 2.45)%, (89.34 ± 2.56)%, (78.40 ± 2.60)%, respectively, all higher than in the damage group (51.04 ± 2.12)% and were statistically significant ($P<0.05$).The activity of LDH in dexmedetomidine groups at varied concentrations(0.001 μmol/L,0.1 μmol/L,10 μmol/L)was significantly lower than that in H₂O₂ group.It was found that 0.1 μmol/L dexmedetomidine had the furthest protective effect against oxidative damage in primary cultures of rat hippocampal neurons induced by H₂O₂.The concentration of MDA and the rate of neuronal apoptosis of dexmedetomidine group(0.1 μmol/L) were much lower than H₂O₂ group,while SOD activity was much higher.In dexmedetomidine group(0.1 μmol/L), the expression of ERK1/2 and BDNF was significantly up-regulated .**Conclusions** Proper dose of dexmedetomidine has remarkable protective effect against oxidative stress in primary cultures of rat hippocampal neurons induced by H₂O₂,the mechanism may be related to decreasing the neuronal apoptosis and enhancing the antioxidation of hippocampal neurons.This function maybe related to the ERK1/2 and BDNF pathway.

Key words: Dexmedetomidine; Oxidative stress; Hippocampal neuron; ERK1/2; BDNF

氧化应激广泛的存在于机体的各种病理生理过程,其广泛地定义为自由基的过度表达,许多中枢神经系统疾病的发生与发展都与其有很多联系。而氧化损伤对于海马神经元来说又是一种修复困难的病理生理过程,当机体失去正常的生理代谢平衡,氧化损伤随即产生,尤其对脑部的氧化应激可能会导致认知功能障碍等^[1-4]。很多研究表明,术后认知功能障碍、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)等多种神经退行性疾病都与海马神经元的氧化应激有关^[5-7]。

右美托咪定是一种高度选择性 α_2 受体激动剂,具有镇静、镇痛、抗交感等药理作用。有研究表明,右美托咪定可以减轻药物对大脑的损害,从而减少大脑的功能改变,这种保护作用可能与ERK1/2信号通路及上游BDNF等有关,但具体机制不明^[8-10]。鉴于此,本研究自2019年3—7月通过观察合适浓度的右美托咪定对体外原代海马神经元氧化应激的影响,探讨其减弱氧化应激的机制,为右美托咪定在临床中的应用提供相关基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂 新生SD大鼠,出生24 h以内,军事医学科学院动物中心提供[SCXK(京):2013-0001],大鼠分笼饲养,自由饮食水,室温20~25℃,湿度50%;盐酸右美托咪定(江苏恩华药业股份有限公司,批号H20090248,批次10061434);DMEM干粉培养基、胰蛋白酶、多聚赖氨酸、阿糖胞苷均为Sigma公司产品;马血清、胎牛血清、微量转铁蛋白(MTF)、考马斯蓝G-250(Hyclone, Amersco);乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(北京雷根生物技术有限公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(北京雷根生物技术有限公司);逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)相关试剂购(Thermo Fisher)等。本研究中对于大鼠的处理符合动物伦理学相关标准。

1.2 原代海马神经细胞培养 将新生24 h内的SD大鼠断头,解剖显微镜下分离取出海马神经元组织;胰蛋白酶消化15 min,加终止液终止消化10 min,1 100 r/min离心5 min,弃去上清。加入含血清培养液,过滤,细胞计数,活细胞终浓度为 5×10^4 /mL,然后将细胞悬液分别种植到96孔板、6孔板中,置于5%二氧化碳、37℃培养箱中培养。24 h后,将种植液吸出,加入相同量含血清饲养液,继续培养。48 h后换液,并加入终浓度为10 μ mol/L阿糖胞苷(arabinofuranoside, Ara-C)。48 h后,将有血清饲养液全部吸出,用DMEM培养液洗涤细胞2次,然后加入无血清培养液,继续培养,此后每3 d半量换液;

每天观察细胞的生长情况,直到海马神经元培养到10 d,备用造模。

1.3 实验分组及处理 将培养10 d的海马神经细胞分为5组($n=6$):(1)损伤对照组(S组):培养液中加入1 mmol/L的过氧化氢(H_2O_2)处理原代海马神经元1 h。(2)右美托咪定组(D组):在加入 H_2O_2 前8 h,分别加入0.001 μ mol/L、0.1 μ mol/L、10 μ mol/L盐酸右美托咪定,然后用 H_2O_2 处理,时间1 h。(3)空白对照组(C组):处理步骤同前两组,每次处理物质为相同量的培养液。观察各项指标的变化。

1.4 神经细胞存活率测定 将20 μ L 噻唑蓝(MTT)溶液(5 mg/mL)加入到各孔中,37℃、5%二氧化碳培养4 h。弃原液,然后加入150 μ L DMSO溶液,振荡10 min,采用酶标仪490 nm波长检测光密度(optical density, OD)值,并根据各组OD值计算细胞存活率。海马神经元存活率(%)=(测定组OD值/空白对照组OD值) $\times 100\%$ 。

1.5 神经细胞损伤的测定 将经过处理的海马神经元细胞培养7 d后,按LDH测定试剂盒说明书要求测定LDH活力(北京雷根生物技术有限公司)。

1.6 MDA含量、SOD活性检测 将经过处理的海马神经元细胞培养7 d后,用0.25%胰酶消化,然后将细胞移入离心管,1 100 r/min,4℃离心10 min,弃去上清液。用生理盐水将细胞沉淀制成 1×10^6 cells/mL的细胞悬液后,分别按照MDA、SOD测定试剂盒(北京雷根生物技术有限公司)说明书的要求测定MDA含量、SOD活性。

1.7 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法测量各组ERK1/2和BDNF mRNA表达量 将经过处理的海马神经元细胞培养7 d后,采用RT-PCR技术检测海马神经元细胞中的细胞外信号调节激酶(ERK)1/2和脑源性神经营养因子(BDNF) mRNA表达变化,反应体系试剂2 $\times$ Premix Type 10 μ L、50 $\times$ Rox Reference Dye II 0.2 μ L、引物0.5 μ L、探针0.8 μ L、DdH₂O 5.2 μ L,引物及探针序列见表1。

PCR反应条件:95℃ 3 min,95℃ 15 s,56℃ 20 s,65℃ 40 s,共40个循环。实验设置3个重复孔。

表1 内源性肌动蛋白(ACTB)、细胞外信号调节激酶(ERK)1/2、脑源性神经营养因子(BDNF)基因的引物及探针序列

序列名称	序列	引物长度
ACTB	正向: TGGTGATGGAGGAGGTTAGTAACT	101
	反向: AACACATTACCTTGTGAATGCCG	
ERK1/2	正向: GGACCGGATGTYAACCTTITA	234
	反向: TGGTTCATCTGTCGGATCAT	
BDNF	正向: GACAAGGCAACTTGGCCTAC	356
	反向: CCTGTCACACDCTCAGCTC	

RT-PCR 对每个样本均进行了 3 次重复试验。扩增结果判定:利用 Quantity One 系统软件检测各组 mRNA 表达量。

1.8 统计学方法 本研究采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较选择 Bonferroni 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右美托咪定对细胞存活率的影响 损伤对照组海马神经细胞存活率(51.04 ± 2.12)%与空白对照组(98.62 ± 0.96)%比较,显著下降($P < 0.01$),右美托咪定组细胞存活率较损伤对照组有所提高($P < 0.05$),但与空白对照组比较,仍呈下降($P < 0.05$)。在右美托咪定组中, $0.1 \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组的细胞存活率为(89.34 ± 2.56)%,与 $0.001 \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组的(72.13 ± 2.45)%及 $10 \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组的(78.40 ± 2.60)%细胞存活率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示过高或者过低浓度的右美托咪定对海马神经细胞的保护作用都会有影响。

2.2 右美托咪定对细胞上清液 LDH 活性的影响 各组通过 LDH 试剂盒测定的细胞上清液中 LDH 活性,结果显示,与空白对照组比较,损伤对照组上清液 LDH 活性显著上升[(9.42 ± 1.25)U/L 比 (3.11 ± 0.52)U/L]($P < 0.01$),右美托咪定组海马神经细胞上清液 LDH 活性较损伤对照组有所下降($P < 0.05$),但与空白对照组上清液 LDH 活性相比较,仍呈上升,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。在右美托咪定组中, $0.1 \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组的上清液 LDH 活性最低,为(5.10 ± 0.98)U/L,显著低于损伤对照组($P < 0.05$),及 $0.001 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组的上清液 LDH 活性[(7.86 ± 1.12)U/L、(6.98 ± 1.06)U/L]($P < 0.05$),进一步证实过高或者过低浓度的右美托咪定对海马神经细胞的保护作用都会有影响。

2.3 右美托咪定对细胞内丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响 与空白对照组比较,损伤对照组原代海马神经元细胞内 MDA 含量显著增多,SOD 活性显著下降($P < 0.05$); $0.1 \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组 MDA 含量较损伤对照组显著减少($P < 0.05$),SOD 活性显著升高($P < 0.05$),而与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 右美托咪定对细胞 ERK1/2 和 BDNF mRNA 表达量的影响 与空白对照组相比,损伤对照组原代海马神经元细胞内 ERK1/2 和 BDNF mRNA 表达明显升高($P < 0.01$); $0.1 \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组 ERK1/2 和 BDNF mRNA 表达较损伤对照组显著提高($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 各组原代海马神经元细胞内丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)测定结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	MDA/(mol/g)	SOD/(U/g)
C 组	6	2.31 ± 0.12	31.72 ± 1.12
S 组	6	4.21 ± 0.24^{①}	14.69 ± 2.10^{①}
D ₂ 组	6	3.56 ± 0.31^{①②}	25.35 ± 1.31^{①②}
F 值		99.851	180.570
P 值		0.000	0.000

注:①与 C 组比较, $P < 0.05$ 。②与 S 组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 各组原代海马神经元细胞内 ERK1/2 和 BDNF mRNA 表达量/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	ERK1/2 mRNA 表达量	BDNF mRNA 表达量
C 组	6	0.023 ± 0.007	0.031 ± 0.014
S 组	6	0.078 ± 0.003^{①}	0.108 ± 0.023^{①}
D ₂ 组	6	0.365 ± 0.012^{①②}	0.478 ± 0.011^{①②}
F 值		3005.317	1215.028
P 值		<0.001	<0.001

注:①与 C 组比较, $P < 0.05$ 。②与 S 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

大脑是人重要的器官,但也是较为脆弱的器官之一,具有灌注高、耗氧高、代谢高而耐受偏低的特点,对氧化应激反应的耐受较其他器官低很多,然而,氧化应激却是神经元细胞受到损伤的重要的病理生理过程,此过程由过多的氧化自由基来执行,当细胞内自由基含量超过细胞自身的清除能力时,过多的自由基可破坏脂质和细胞膜及产生蛋白、核酸等,造成氧自由基损伤。研究提示,在神经退行性疾病的发病中氧化应激起非常重要的作用。有文献报道, H_2O_2 可直接损伤细胞膜,使膜脂类和蛋白质发生过氧化反应。而利用低浓度 H_2O_2 可以建立原代培养神经细胞凋亡模型^[11-13]。

合理的应用药物干预神经细胞氧化应激反应,对保护神经细胞功能具有非常重要的意义。有研究表明,目前有多种麻醉药物具有神经保护的功能。右美托咪定目前临床应用较为广泛的麻醉药,其主要作用于脑和脊髓的 α_2 肾上腺素受体。在临床麻醉中,右美托咪定既可以作为麻醉前用药,又可以作为全身麻醉、局部麻醉的辅助用药。有研究表明,右美托咪定具有神经保护功能,这种功能可能通过减轻缺血缺氧以及药物对大脑的损害而实现^[14]。

本研究观察了不同剂量右美托咪定具有减轻原代海马神经元细胞的氧化应激后神经损伤的作用。本研究结果显示,适宜浓度的右美托咪定能够显著提高海马元代神经细胞的存活率,并能够使细胞上清液中 LDH 活性降低,提示其对原代海马神

经细胞的氧化损伤有一定拮抗作用,可能与其促进抑制细胞凋亡的基因表达有关。但当右美托咪定的浓度继续上升时,这种作用未见明显的增强,甚至出现负向变化。本研究中 $0.001\ \mu\text{mol/L}$ 、 $10\ \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组的细胞存活率和上清液LDH活性较 $0.1\ \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组存在明显差异,证实过高或者过低浓度的右美托咪定对海马神经细胞的保护作用都会有影响,具体机制有待进一步的研究证明。

丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性可以很好的反应机体氧化损伤水平,本研究发现,在加入右美托咪定后,海马神经细胞内丙二醛含量显著降低,同时超氧化物歧化酶的活性大幅提升,从而使其抗氧化能力增强,这些变化可能与右美托咪定可减弱原代海马神经元细胞氧化应激损伤的作用有关。

右美托咪定通过作用于海马组织神经元突触前膜上的 α_2 受体,促使去甲肾上腺素释放减少,最终导致ERK1/2、BDNF表达增加,从而对体外原代海马神经元细胞的氧化应激损伤产生保护作用^[15]。本研究结果也表明,与损伤对照组相比, $0.1\ \mu\text{mol/L}$ 右美托咪定组ERK1/2、BDNF表达量升高,从一定程度上间接证明适宜剂量的右美托咪定有可能是通过ERK1/2、BDNF信号通路发挥作用的。介于本实验的设计,蛋白表达产物未列入测定,待后续的研究中将进一步完善。

本研究表明,适宜剂量的右美托咪定对海马神经元的氧化应激损伤有一定的保护作用,其作用机制可能与其能够提升海马神经细胞的抗氧化能力,从而抑制海马神经元的凋亡有关,这种功能可能ERK1/2和BDNF信号通路有关。有关其神经保护作用的具体详细作用机制还待进一步研究。

参考文献

- [1] BISWAL S, RIZWAN H, PAL S, et al. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children [J]. Hematology (Amsterdam, Netherlands), 2019, 24(1): 1-9.
- [2] SINGH MM, KUMAR R, TEWARI S, et al. Association of GSTT1/GSTM1 and ApoE variants with left ventricular diastolic dysfunction in thalassaemia major patients [J]. Hematology, 2019, 24(1):

20-25.

- [3] VÁZQUEZ J, GRILLITSCH K, DAUM G, et al. The role of the membrane lipid composition in the oxidative stress tolerance of different wine yeasts [J]. Food Microbiology, 2019, 78: 143-154.
- [4] YAGI S, GALEA L. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis [J]. Neuropsychopharmacology, 2019, 44(1): 200-213.
- [5] ALALAWI R, YASMEEN N. Postoperative cognitive dysfunction in the elderly: a review comparing the effects of desflurane and sevoflurane [J]. Journal of Perianesthesia Nursing, 2018, 33(5): 732-740.
- [6] GIAU VVAN, AN S, HMLME JP. Mitochondrial therapeutic interventions in Alzheimer's disease [J]. Journal of the Neurological Sciences, 2018, 395: 62-70.
- [7] PAML KC, CHUANG YH, COCKBURN M, et al. Organophosphate pesticide exposure and differential genome-wide DNA methylation [J]. The Science of the Total Environment, 2018, 645: 1135-1143.
- [8] MARSHALL JM, LADD MD, WELDON BC. Prevention of persistent postoperative hiccups with dexmedetomidine [J]. Journal of Clinical Anesthesia, 2019, 52: 50.
- [9] XU HP, ZHAO B, She Y, et al. Dexmedetomidine ameliorates lidocaine-induced spinal neurotoxicity via inhibiting glutamate release and the PKC pathway [J]. Neurotoxicology, 2018, 69: 77-83.
- [10] WANG YQ, TANG YF, YANG MK, et al. Dexmedetomidine alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. J Cell Biochem, 2018, 19: 28058.
- [11] YARIBEYGI H, BUTLER AE, BARRETO GE, et al. Antioxidative potential of antidiabetic agents: a possible protective mechanism against vascular complications in diabetic patients [J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(3): 2436-2446.
- [12] MOREIRA JC, GALLINARI MDE O, RAHAL V, et al. Effects of enzymatic activation of bleaching gels on hydrogen peroxide degradation rates, bleaching effectiveness, and cytotoxicity [J]. Brazilian Dental Journal, 2016, 27(4): 399-403.
- [13] JARDIM AP, NEVES RS, CABOCLO LO, et al. Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome [J]. Arq Neuropsiquiatr, 2012, 70(5): 319-324.
- [14] 程加文, 刘金东. 右美托咪定对七氟醚麻醉后老年小鼠早期认知功能障碍的影响 [J]. 徐州医学院学报, 2016, 33(12): 839-843.
- [15] 张艺, 王江荟, 薛文达, 等. 越鞠甘麦大枣汤调节小鼠海马PKA CREB BDNF信号通路的抗抑郁作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(6): 572-577.

(收稿日期: 2019-08-29, 修回日期: 2019-10-07)