

论著·基础研究

丙泊酚镇静对大鼠海马 BDNF-TrkB/p75 信号和认知功能的影响

于文娟^{1*}, 朱敏^{2*}, 沃雁³, 余一旻¹, 李妍¹, 方洪伟^{4#}, 朱浩^{4#}

1. 上海交通大学医学院附属精神卫生中心, 上海 200030; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院南院药剂科, 上海 201100; 3. 上海交通大学医学院解剖学系, 上海 200025; 4. 上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科, 上海 200127

[摘要] **目的**·探讨丙泊酚镇静对大鼠认知功能的影响及其可能的机制。**方法**·48 只 SD 大鼠被随机分为 3 组。10 mg/mL 丙泊酚注射液以 100 mg/kg 或 300 mg/kg 腹腔注射 45 min 后, 用定量 PCR 检测大鼠海马脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)-TrkB/p75 信号分子的 mRNA 水平; 并用逃避性抑制 (inhibitory avoidance, IA) 试验评价丙泊酚作用后的大鼠学习记忆情况。**结果**·丙泊酚腹腔注射 45 min 后, 100 mg/kg 组和 300 mg/kg 组大鼠海马组织中 BDNF 的 mRNA 水平分别是对照组的 (1.20 ± 0.13) 倍 ($P=0.002$) 和 $(88 \pm 12)\%$ ($P=0.044$); 100 mg/kg 组和 300 mg/kg 组大鼠海马组织中 TrkB 的 mRNA 水平分别是对照组的 (1.01 ± 0.11) 倍 ($P=0.982$) 和 $(86 \pm 11)\%$ ($P=0.018$)。另外, p75 的 mRNA 水平分别是对照组的 (1.02 ± 0.10) 倍 ($P=0.778$) 和 (1.59 ± 0.18) 倍 ($P=0.000$)。100 mg/kg 组大鼠 IA 的潜伏期与对照组的差异无统计学意义 ($P=0.875$); 300 mg/kg 组大鼠 IA 的潜伏期显著低于对照组 ($P=0.028$), 亦显著低于 100 mg/kg 组 ($P=0.020$)。**结论**·丙泊酚呈剂量依赖性调节海马 BDNF-TrkB/p75 信号分子的表达, 高剂量丙泊酚可能通过调节海马 BDNF-TrkB/p75 信号进而影响大鼠的认知功能。

[关键词] 丙泊酚; 脑源性神经营养因子; 海马; 镇静**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.06.002 **[中图分类号]** R964 **[文献标志码]** A

Effects of propofol sedation on BDNF-TrkB/p75 signal and cognitive function in rat hippocampus

YU Wen-juan^{1*}, ZHU Min^{2*}, WO Yan³, YU Yi-min¹, LI Yan¹, FANG Hong-wei^{4#}, ZHU Hao^{4#}

1. Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; 2. Department of Pharmacy, South Campus, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201100, China; 3. Department of Anatomy, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 4. Department of Anesthesiology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

[Abstract] **Objective**·To detect the effects of propofol sedation on cognitive function in rats and its mechanism. **Methods**·Forty-eight SD rats were randomly divided into three groups, i.e. control group, 100 mg/kg group and 300 mg/kg group. Rats were administrated intraperitoneally with propofol (10 mg/mL, 100 mg/kg or 300 mg/kg). The mRNA levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF)-TrkB/p75 signal molecules in rat hippocampus were evaluated by realtime PCR 45 min after propofol treatment. Learning and memory ability was examined by inhibitory avoidance (IA) test after propofol treatment. **Results**·The mRNA levels of BDNF in the hippocampal tissue were (1.20 ± 0.13) fold ($P=0.002$) and $(88 \pm 12)\%$ ($P=0.044$) of that in control group, respectively, in 100 mg/kg group and 300 mg/kg group after injection of propofol. The mRNA levels of TrkB were (1.01 ± 0.11) fold ($P=0.982$) and $(86 \pm 11)\%$ ($P=0.018$) of that in control group, respectively, in 100 mg/kg group and 300 mg/kg group. The mRNA levels of p75 were (1.02 ± 0.10) fold ($P=0.778$) and (1.59 ± 0.18) fold ($P=0.000$) of that in control group, respectively, in 100 mg/kg group and 300 mg/kg group. There was no significant difference of the 24 h IA memory retention latency between 100 mg/kg group and control group. The 24 h IA memory retention latency in 300 mg/kg group was significantly decreased compared with control group ($P=0.028$) and 100 mg/kg group ($P=0.020$). **Conclusion**·Propofol dose-dependently regulates the expression of BDNF-TrkB/p75 signal molecules, and high dose propofol may reduce cognitive function via BDNF-TrkB/p75 signal.

[Key words] propofol; brain derived neurotrophic factor; hippocampus; sedation

丙泊酚 (propofol) 是临床上最常用的静脉麻醉药之一, 具有起效快、苏醒迅速、对呼吸道无刺激等优点, 被广泛用于全身麻醉的诱导、维持以及诊疗的镇静中^[1]。丙

泊酚可能通过 γ -氨基丁酸 A 亚型 (γ aminobutyric acid A subtype, GABA_A) 受体和 / 或 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体改变中枢神经系统

[基金项目] 国家自然科学基金 (81201505, 81772431); 上海市自然科学基金 (12ZR1446000); 上海市科学技术委员会项目 (17411970300) (National Natural Science Foundation of China, 81201505, 81772431; Shanghai Natural Science Foundation, 12ZR1446000; Shanghai Committee of Science and Technology Research Project, 17411970300)。

[作者简介] 于文娟 (1979—), 女, 副主任医师, 博士; 电子信箱: wenjuanyu2004@163.com。朱敏 (1982—), 男, 药师, 学士; 电子信箱: fanren_1982@163.com。* 为共同第一作者。

[通信作者] 方洪伟, 电子信箱: hongwei_fang163@163.com。朱浩, 电子信箱: zhuhaossmu@163.com。# 为共同通信作者。

的兴奋性而发挥麻醉作用^[2], 但是丙泊酚对认知功能的影响及其机制却仍然不清楚。脑源性神经营养因子 (brain derived neurotropic factor, BDNF) 在中枢神经系统内分布十分广泛, 主要表达于海马、杏仁核和皮质等区域^[3]。BDNF 在活性依赖的突触结构和功能调节中发挥重要作用, 尤其是谷氨酸能突触^[4]。BDNF 主要通过与其细胞膜上高亲和力受体 (即 TrkB) 以及低亲和力受体 (即 p75) 作用, 激活胞内的下游信号, 从而调节突触功能^[5]。本研究通过检测丙泊酚镇静过程中海马 BDNF-TrkB/p75 信号分子表达变化以及镇静后认知功能情况, 分析探讨丙泊酚对认知功能的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只, 体质量 200 ~ 250 g, 由上海交通大学医学院动物实验科学部提供。动物生产和使用许可证号码分别为 SCXK (沪) 2004-0001 和 SYXK (沪) 2003-0026。实验前在动物房饲养至少 3 d, 维持室温 (23±1) ℃, 采用 12 h 昼夜节律 (8:00—20:00)。所有实验都在 9:00—17:00 之间完成。整个实验过程中饮水及进食均自由。动物实验操作符合动物伦理学规范。

1.2 药物和分组

大鼠随机分为 3 组, 即脂肪乳组 (对照组)、100 mg/kg 丙泊酚组和 300 mg/kg 丙泊酚组, 每组 16 只。给药组大鼠腹腔注射 100 mg/kg 或 300 mg/kg 丙泊酚注射液 (10 mg/mL, Disoprivan, AstraZeneca), 对照组腹腔注射 5% 脂肪乳剂。注射药物后将大鼠放置于 37℃ 恒温充氧保温箱中。

1.3 定量 PCR 检测

每组 8 只大鼠在丙泊酚注射 45 min 后冰上断头取海马, TRIzol 法提取海马总 RNA。定量 PCR 检测 BDNF、TrkB 和 p75 的 mRNA 水平, 方法参照课题组前期研究^[6]。用反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit, TaKaRa 公司, 日本) 进行快速反转录。使用定量 PCR 仪 (ABI Step One Plus Real-time PCR System) 及 SYBR Green 相对定量法检测 BDNF、TrkB 和 p75 的 mRNA 水平。上述基因表达水平使用内源性甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因作为内参标化, 并用 ΔΔC_t 法分析实验结果。所用基因引物序列见表 1。

表 1 定量 PCR 所用基因引物序列
Tab 1 Primer sequences used in realtime-PCR

基因名称	正向 (5'→3')	反向 (5'→3')
BDNF	GTCACAGCGGCAGATAAAAAG	ATGGGATTACACTTGGTCTCGT
TrkB	CGACACTCAGGATTGTATTGC	ATGGTCACAGACTTCCCTTCC
p75	AGCAGACCCATACGCAGACT	GCAGTTTCTCTACCTCCTCAC
GAPDH	AGGGTGGTGGACCTCATGG	AGCAACTGAGGGCCTCTCTCTT

1.4 逃避性抑制试验

在丙泊酚注射后第 2 日, 将每组剩余 8 只大鼠背朝隔离门置入逃避性抑制 (inhibitory avoidance, IA) 训练仪的明室中。当大鼠面向升降门时, 把门升起, 暴露暗室。当大鼠四足全部迈进暗室时即将升降门关闭, 给予大鼠足部单次电击 (0.4 mA, 2 s), 随后将大鼠取出。24 h 后, 检测大鼠 IA 记忆: 将大鼠再次置入 IA 训练仪的明室中, 记录大鼠进入暗室前在明室内停留的时间 (即潜伏期, 潜伏期越长代表大鼠记忆越好)。潜伏期上限为 600 s, 超过亦记作 600 s。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 实验数据中定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析, 两两多重比较采用 LSD 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

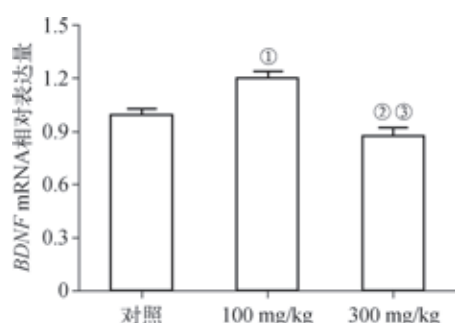
2 结果

2.1 丙泊酚对海马中 BDNF mRNA 水平的影响

定量 PCR 检测结果显示, 丙泊酚腹腔注射 45 min 后, 100 mg/kg 组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 水平是对照组的 (1.20±0.13) 倍 (P=0.002, 图 1)。300 mg/kg 组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 水平仅是对照组的 (88±12)% (P=0.044), 亦低于 100 mg/kg 组 (P=0.000, 图 1)。表明丙泊酚既能上调海马中 BDNF 的 mRNA 水平, 亦能下调其水平, 丙泊酚调节海马 BDNF 水平的作用与剂量有关。

2.2 丙泊酚对海马中 TrkB mRNA 水平的影响

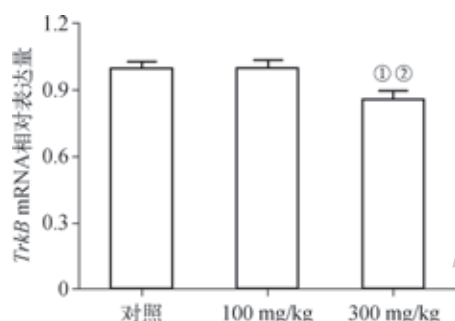
丙泊酚腹腔注射 45 min 后, 100 mg/kg 组大鼠海马组织中 TrkB 的 mRNA 水平是对照组的 (1.01±0.11) 倍, 但差异无统计学意义 (P=0.982, 图 2)。300 mg/kg 组大鼠海马组织中 TrkB 的 mRNA 水平是对照组的 (86±11)% (P=0.018), 亦低于 100 mg/kg 组 (P=0.019, 图 2)。表明随着剂量的增加, 丙泊酚可降低海马中 TrkB 的水平。



注: ^① $P=0.002$, ^② $P=0.044$, 与对照组比较; ^③ $P=0.000$, 与 100 mg/kg 组比较。

图 1 定量 PCR 检测丙泊酚注射后各组大鼠海马中 BDNF mRNA 水平

Fig 1 mRNA levels of BDNF in the hippocampus after propofol injection detected by realtime-PCR



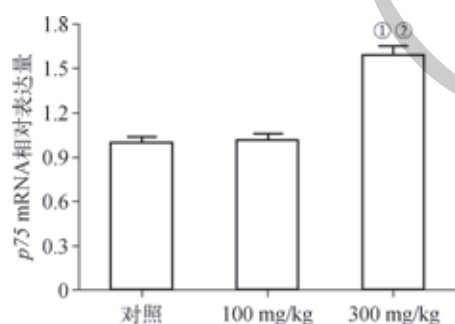
注: ^① $P=0.018$, 与对照组比较; ^② $P=0.019$, 与 100 mg/kg 组比较。

图 2 定量 PCR 检测丙泊酚注射后各组大鼠海马中 TrkB 的 mRNA 水平

Fig 2 mRNA levels of TrkB in the hippocampus after propofol injection detected by realtime-PCR

2.3 丙泊酚对海马中 p75 mRNA 水平的影响

丙泊酚腹腔注射 45 min 后, 100 mg/kg 组大鼠海马组织中 p75 的 mRNA 水平是对照组的 (1.02 ± 0.10) 倍, 但差异无统计学意义 ($P=0.778$, 图 3)。300 mg/kg 组大鼠海马组织中 p75 的 mRNA 水平是对照组的 (1.59 ± 0.18) 倍 ($P=0.000$), 亦高于 100 mg/kg 组 ($P=0.000$, 图 3)。表明随着剂量的增加, 丙泊酚可提高海马中 p75 的水平。



注: ^① $P=0.000$, 与对照组比较; ^② $P=0.000$, 与 100 mg/kg 组比较。

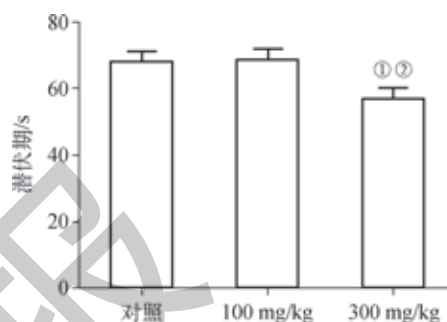
图 3 定量 PCR 检测丙泊酚注射后各组大鼠海马中 p75 的 mRNA 水平

Fig 3 mRNA levels of p75 in the hippocampus after propofol injection detected by realtime-PCR

2.4 丙泊酚降低大鼠 IA 的潜伏期

IA 试验结果显示, 对照组、100 mg/kg 组、300 mg/kg

组大鼠 IA 的潜伏期分别为 (67 ± 4) s、(69 ± 3) s、(57 ± 4) s (图 4)。100 mg/kg 组大鼠 IA 的潜伏期与对照组的差异无统计学意义 ($P=0.875$); 300 mg/kg 组大鼠 IA 的潜伏期显著短于对照组 ($P=0.028$), 亦显著短于 100 mg/kg 组 ($P=0.020$, 图 4)。表明高剂量丙泊酚可缩短大鼠 IA 的潜伏期, 降低大鼠认知功能。



注: ^① $P=0.028$, 与对照组比较; ^② $P=0.020$, 与 100 mg/kg 组比较。

图 4 IA 试验检测大鼠 24 h 记忆保持的时间 (潜伏期)

Fig 4 24 h inhibitory avoidance memory retention performance (latency)

3 讨论

海马是具有特殊功能的脑区, 如空间学习、记忆、情感调节以及模式辨认等, 在各种行为和认知功能中具有重要作用。本研究表明丙泊酚可呈剂量依赖性调节海马 BDNF-TrkB/p75 信号表达, 且低剂量丙泊酚对认知功能无明显影响, 而高剂量丙泊酚却显著降低认知功能。

BDNF 是一个神经营养因子家族的成员, 除了促进神经元的增殖和分化外, 它还影响树突棘的形状和数目, 而这些正是神经信息处理能力的决定因素^[7-8]。此外, BDNF 可调节与学习记忆有关的海马突触可塑性的形式, 学习记忆的获得伴随着海马 BDNF 的 mRNA 表达增加^[9]。通过与 TrkB 或 p75 作用, BDNF 分别调节海马依赖的突触可塑性形式——长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 和长时程抑制 (long-term depression, LTD)^[5]。BDNF 与 TrkB 结合, 导致受体自主磷酸化, 随后激活胞内信号通路, 包括 MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK (extracellular signal regulated kinase)、PLC- γ (phospholipase C- γ) 和 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 通路等, 进而促进神经递质合成和释放^[5,9]。BDNF 结合 p75 后, 促使 p75 胞内区与 RIP2 (receptor-interacting protein 2) 激酶、TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)、MAGE (melanoma antigen)、NRIF (neurotrophin receptor interacting factor) 等结合, 激活 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 和 JNK (c-Jun N-terminal kinase); 激活 RhoA、抑制 Rac 信号进而调节限制突触棘生长的神经突触可塑性^[10-12]。p75 广泛表

达于发育期的中枢神经系统, 随后呈低水平状态存在于成年中枢神经系统; 在成年大鼠脑中, p75 表达于海马 CA1、CA3 区和齿状回^[13]; 缺乏 p75 的成年大鼠海马齿状回前体细胞增殖和成熟度降低^[11]。在疾病或损伤的条件下, p75 表达水平被迅速上调^[14]。

有研究显示丙泊酚可下调体外培养海马神经元 BDNF 表达, 降低细胞活性, 诱导神经元凋亡^[15]; 并且体内研究亦表明丙泊酚能引起发育中的啮齿动物脑内神经细胞凋亡^[2]; 此类麻醉诱导的凋亡至少部分与 BDNF 调节的信号级联有关^[15]。另外, 丙泊酚处理孕后期的大鼠, 可致子代脑内 BDNF、TrkB 水平降低, 而且丙泊酚能降低新生小鼠海马 CA1 区突触可塑性相关蛋白水平, 从而抑制 LTP^[9]。丙泊酚还可通过 p75 信号通路对创伤后成年小鼠产生神经毒性作用^[16]。但是以上研究的对象大部分是体外神经细胞或发育阶段的中枢神经系统, 关于正常成年脑的研究却较少。此外, 丙泊酚对中枢神经系统的毒性作用与剂量有

关。高剂量丙泊酚明显导致神经细胞凋亡^[15], 而低剂量丙泊酚又有神经保护作用^[17]。连续 5 d 腹腔注射 50 mg/kg 丙泊酚的新生大鼠脑内未出现明显的神经细胞凋亡情况; 而 150 mg/kg 组的大鼠脑内却存在明显的神经细胞凋亡^[18]。Peters 等^[19]亦发现麻醉剂量的丙泊酚可保护神经细胞, 抑制氧化应激反应。本研究显示丙泊酚在低剂量时可提高海马 BDNF 表达, 但不影响 TrkB 和 p75 的表达, 也不影响认知功能; 而在高剂量时却降低 BDNF、TrkB 的表达, 提高 p75 的表达, 降低认知功能。所以, 在低剂量时, 丙泊酚具有镇静作用, 但不影响脑的认知功能; 而在高剂量时, 虽然也具有镇静作用, 但可能通过影响 BDNF-TrkB/p75 信号表达进而产生神经毒性作用, 影响术后认知功能。

因此, 在临床上使用丙泊酚镇静过程中, 应使用合适的剂量范围, 避免产生神经毒性作用, 导致术后认知功能障碍。

参 考 文 献

- [1] He J, Huang C, Jiang J, et al. Propofol exerts hippocampal neuron protective effects *via* up-regulation of metallothionein-3[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(2): 165-171.
- [2] Yu D, Jiang Y, Gao J, et al. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 41-46.
- [3] Pillai A. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia[J]. *Neurosignals*, 2008, 16(2-3): 183-193.
- [4] Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, et al. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(Suppl 1): S310-S324.
- [5] Pandya CD, Kutianawalla A, Pillai A. BDNF-TrkB signaling and neuroprotection in schizophrenia[J]. *Asian J Psychiatr*, 2013, 6(1): 22-28.
- [6] Yu W, Zhu H, Wang Y, et al. Reactive transformation and increased BDNF signaling by hippocampal astrocytes in response to MK-801[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145651.
- [7] Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity[J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(5): 271-288.
- [8] Kuczewski N, Porcher C, Gaiarsa JL. Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity[J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 32(8): 1239-1244.
- [9] Zhong L, Luo F, Zhao W, et al. Propofol exposure during late stages of pregnancy impairs learning and memory in rat offspring *via* the BDNF-TrkB signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(10): 1920-1931.
- [10] Yao XQ, Jiao SS, Saadipour K, et al. p75NTR ectodomain is a physiological neuroprotective molecule against amyloid- β toxicity in the brain of Alzheimer's disease[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(11): 1301-1310.
- [11] Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(5): 721-725.
- [12] Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling[J]. *F1000Res*, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.8434.1. eCollection 2016.
- [13] Meeker R, Williams K. Dynamic nature of the p75 neurotrophin receptor in response to injury and disease[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014, 9(5): 615-628.
- [14] Brito V, Puigdel·l·v·l· M, Giralt A, et al. Imbalance of p75(NTR)/TrkB protein expression in Huntington's disease: implication for neuroprotective therapies[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e595.
- [15] Wei Y, Hu J, Liang Y, et al. Dexmedetomidine pretreatment attenuates propofol-induced neurotoxicity in neuronal cultures from the rat hippocampus[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3413-3420.
- [16] Sebastiani A, Granold M, Ditter A, et al. Posttraumatic propofol neurotoxicity is mediated *via* the pro-brain-derived neurotrophic factor-p75 neurotrophin receptor pathway in adult mice[J]. *Crit Care Med*, 2016, 44(2): e70-e82.
- [17] Zhao CH, Li GH, Wang Q, et al. Mechanisms of propofol attenuation of ketamine-induced neonatal brain injury[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(1): 133-137.
- [18] Yan Y, Qiao S, Kikuchi C, et al. Propofol induces apoptosis of neurons but not astrocytes, oligodendrocytes, or neural stem cells in the neonatal mouse hippocampus[J]. *Brain Sci*, 2017, 7(10): pii: E130.
- [19] Peters CE, Korcok J, Gelb AW, et al. Anesthetic concentrations of propofol protect against oxidative stress in primary astrocyte cultures: comparison with hypothermia[J]. *Anesthesiology*, 2001, 94(2): 313-321.

[收稿日期] 2018-02-07

[本文编辑] 邵碧云

