

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.01.004

异氟烷对小鼠神经干细胞 BDNF/Caspase3 及 Notch 信号相关基因表达的影响 *

周翠红¹ 顾 婷² 何珊珊¹ 李 锐¹ 彭正午¹ 王化宁^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院心身科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨异氟烷对小鼠神经干细胞的 BDNF、Caspase3 及 Notch 信号相关基因表达的影响。**方法:**给予体外培养的新生小鼠海马神经干细胞不同浓度异氟烷处理, 实验分为对照组和异氟烷处理组 (ISO1.0, ISO1.5), 其中异氟烷组细胞分别给予 1.0 MAC 和 1.5 MAC 两个浓度的异氟烷处理 2 小时, 对照组给予 O₂ 处理 2 小时, 随后置于培养箱正常培养 24 小时后收集细胞, 提取细胞 RNA 检测 BDNF、Caspase3 及 Notch 相关基因 (Notch2、Notch 3 和 Hes5) 的 mRNA 水平变化。**结果:**与对照组相比, (1) 异氟烷组小鼠神经干细胞的功能基因 BDNF mRNA 水平下调, 凋亡相关基因 Caspase3 的 mRNA 水平上调; (2) 异氟烷组神经干细胞的 Notch2 和 Notch3 受体 mRNA 表达下调, Notch 信号通路靶基因 Hes5 的 mRNA 水平也明显下调; (3) 异氟烷对神经干细胞的作用具有剂量依赖性, 浓度越高对神经干细胞 BDNF、Caspase3 及 Notch 信号相关基因表达的影响越大。**结论:**异氟烷可能通过抑制小鼠神经干细胞的 Notch 信号通路, 下调 BDNF 的 mRNA 表达, 上调 Caspase3 的 mRNA 水平, 影响神经干细胞的正常功能。

关键词: 异氟烷; 神经干细胞; Notch; BDNF

中图分类号: R-33; Q593.2; R614 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)01-16-04

Effect of Isoflurane on Expression of BDNF/Caspase3 and Notch in Cultured Neural Stem Cells*

ZHOU Cui-hong¹, GU Ting², HE Shan-shan¹, LI Rui¹, PENG Zheng-wu¹, WANG Hua-ning^{1Δ}

(1 Department of Psychosomatic, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of isoflurane on the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF), Caspase3 and Notch signaling in neural stem cells. **Methods:** Cultured hippocampal neural stem cells (NSCs) from newborn mice were divided into control and isoflurane groups: control group was treated with O₂ for 2 hours and isoflurane treatment groups (ISO1.0 or ISO1.5) were treated with 1.0 MAC and 1.5 MAC of isoflurane for 2 hours respectively. Then cells were cultured in the incubator with 5% CO₂ and 37°C for 24 hours. And the total RNA was extracted from cells and the mRNA levels of BDNF, Caspase3, Notch2, Notch3, and Hes5 were measured by Real-time PCR. **Results:** (1) Compared with the control, isoflurane significantly down-regulated the BDNF mRNA level and up-regulated the Caspase3 mRNA level in the neural stem cells; (2) Isoflurane significantly decreased the mRNA levels of Notch2, Notch3 and Hes5 in the neural stem cells; (3) The effect of isoflurane revealed a dose effect---compared with ISO1.0 group, cells treated with 1.5 MAC of isoflurane suffered more influence. **Conclusion:** Isoflurane exposure suppressed the BDNF expression and increased apoptosis of cultured neural stem cells, and this effect possibly mediated by Notch signal pathway.

Key words: Isoflurane; Neural stem cells; Notch; BDNF

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2; R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)01-16-04

前言

异氟烷是临床上常用的吸入麻醉剂之一, 已经在临床得到广泛应用^[1,2]。近年来, 异氟烷对婴幼儿神经发育的影响受到了医生和患者的高度关注^[3]; 研究表明异氟烷会影响中枢神经的发育, 导致婴幼儿或幼龄动物发育期后认知功能下降^[4-6]; 异氟烷还可以损伤新生大鼠的海马神经干细胞的活性及功能, 促使

神经元凋亡而影响系统神经发育造成个体认知功能障碍^[7,8], 但是异氟烷如何作用于神经干细胞而影响神经发育的分子机制并不清楚。

Notch 信号通路是决定神经干细胞分化命运的关键因素, 在神经干细胞发育中发挥重要作用, 维持着神经干细胞增殖、分化、凋亡之间的平衡^[9]。近年来的研究发现, 异氟烷有可能通过影响 Notch 信号通路发挥其生物学功能^[10]。但是异氟烷是否

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81401109, 81571309)

作者简介: 周翠红(1986-), 女, 硕士, 初级研究员, 主要从事精神疾病方面研究, E-mail: zch4610@126.com

Δ 通讯作者: 王化宁, E-mail: xskzhu@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2016-06-03 接受日期: 2016-06-20)

会扰乱 Notch 信号相关基因表达水平而影响神经干细胞功能并不清楚。因此,本实验从小鼠海马分离获得神经干细胞,研究了异氟烷对神经干细胞的 BDNF 和 Caspase3 以及 Notch 信号通路相关受体和靶基因 mRNA 表达的作用。

1 材料方法

1.1 材料

神经干细胞来源于发育 14.5~16.5 天的小鼠胎儿大脑海马。神经干细胞培养试剂:DMEM/F12(Hyclone),20 mg/mL 碱性成纤维细胞生长因子 bFGF (Peprotech,100-18B, USA),20 ng/mL 上皮细胞生长因子 EGF(Peprotech,400-25, USA)。

其他试剂:异氟烷(扬子江药业集团有限公司),TRIZOL(TAKARA,108-95-2),反转录试剂盒(TAKARA,RR036A),SYBR Premix Ex Taq(TAKARA,RR820A)。

实验仪器:恒温细胞培养箱(Thermo Scientific),PCR 仪(Thermo Scientific),实时定量 PCR 仪(Thermo Scientific Piko-Real)。

1.2 实验方法

原代神经干细胞培养:无菌条件下取小鼠胎儿大脑,分离海马,剪碎后用 0.5%胰酶 37℃下消化 5 min,血清中和后离心去上清,然后加入 DNase I 50 U/mL 孵育 10 min,200 目网筛过滤,离心后取细胞沉淀重新悬浮于 DMEM 中清洗 3 次,加入含生长因子培养基后接种于细胞培养瓶,置于 5% CO₂ 37℃恒温箱中培养。

异氟烷处理:培养好的细胞分为对照组,ISO1.0 组和 ISO1.5 组三组放入试验箱中进行处理,其中 ISO1.0 组和 ISO1.5 组分别给予 1.0 MAC,1.5 MAC 的异氟烷处理 2 h,对照组给予 O₂ 处理 2 h,然后换正常条件(5% CO₂,37℃恒温)培养 24 h 后收取细胞样本提取 RNA。

基因表达检测:TRIZOL 提取 RNA 后,使用反转录试剂盒反转录成 cDNA,然后进行实时定量 PCR(Real Time-PCR)检测 BDNF,Caspase3,Notch2,Notch3,Hes5 基因相对于内参基因 Gapdh 的 mRNA 表达情况。RT-PCR 引物由 TAKARA 公司合成,序列如表 1 所示。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of Real-time PCR

Gene	Forward	Reverse
Bdnf	TCATACTTCGGTTGCATGAAGG	ACACCTGGGTAGGCCAAGTT
Notch2	GCTGTCAATAATGTGGAGGCG	TTGGCCGCTTCATAACTTCC
Notch3	CTTCCACTGTGAGATTGACTTGC	CTCGTATTGGCAGTGTGTGC
Caspase3	AACCAGATCACAACTTCTGCAAA	TGGAGTCCAGTGAACCTTCTTCAG
Hes5	AGTCCCAAGGAGAAAAACCGA	GCTGTGTTTCAGGTAGCTGAC
Gapdh	CCAATGTGTCCGTCGTGGATCT	GTTGAAGTCGCAGGAGACAACC

1.3 统计学处理

用 SPSS19.0 进行数据统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组之间比较用单因素方差分析,两两数据比较前进行方差齐性检验,满足方差齐性则采用 LSD-t 检验,方差不齐则采用 Dunnett T 检验。设 $P < 0.05$ 时有统计学意义。符合正态分布的观测量之间相关分析采用 Pearson 检验。设 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 异氟烷在体外下调神经干细胞的 BDNF mRNA 水平,上调凋亡基因 Caspase3 的 mRNA 表达

BDNF 是神经干细胞正常发挥功能的重要细胞因子,我们给予体外培养的神经干细胞异氟烷处理后,检测了其 BDNF 的 mRNA 表达变化。如图 1A 所示,异氟烷明显抑制了神经干细胞的 BDNF mRNA 表达,异氟烷浓度越高抑制作用越强。处理组 ISO1.0 和 ISO1.5 的 BDNF mRNA 水平 (0.776 ± 0.008 , 0.364 ± 0.058)与对照 O₂ 组(1.458 ± 0.048)相比较有显著差异($P < 0.01$)。同时,我们检测了异氟烷对细胞凋亡的作用,结果如图 1B 所示,处理组 ISO1.0(1.783 ± 0.062)和 ISO1.5(2.267 ± 0.056)的凋亡相关基因 Caspase3 表达较对照 O₂ 组(1.479 ± 0.049)明显升高($P < 0.01$),表明异氟烷处理促使神经干细胞凋亡。

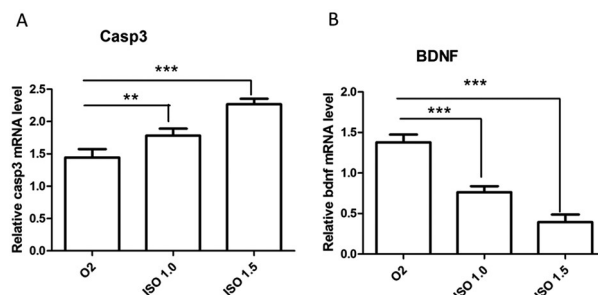


图 1 不同浓度异氟烷处理后神经干细胞 BDNF 和 Caspase3 基因表达变化

Fig.1 Effect of isoflurane on the expression of BDNF/Caspase3 in cultured NSCs

2.2 异氟烷调控神经干细胞的 Notch 受体及靶基因表达

Notch 信号通路在神经干细胞的增殖分化以及凋亡过程中发挥重要作用,因此我们检测了体外异氟烷处理对小鼠神经干细胞的 Notch 受体及靶基因表达的影响。结果如图 2 所示,与 O₂ 对照组(37.618 ± 0.212 , 30.583 ± 4.230)相比,异氟烷处理组 ISO1.0(32.213 ± 2.092 , 7.490 ± 2.095),ISO1.5(9.615 ± 2.249 , 2.084 ± 0.240)明显抑制了 Notch2(图 2A)和 Notch3(图 2B)受体基因表达($P < 0.01$),异氟烷浓度越高抑制作用越明显。Hes5 是 Notch 信号通路下游一个很重要的靶基因,异氟烷不仅抑制

了 Notch 受体基因的表达,下游靶基因 Hes5 也被抑制。如图 2C 所示,与 O₂ 对照组 (5.220± 0.250) 相比,异氟烷处理组

ISO1.0 (1.947± 0.204),ISO1.5 (1.730± 0.049) 细胞的 Hes5 mRNA 水平明显下调,并且有统计差异 (P < 0.01)。

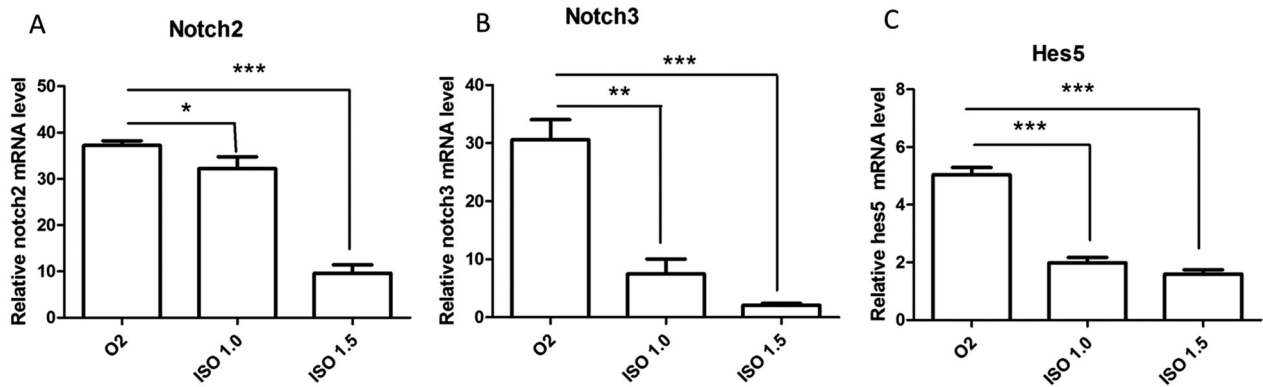


图 2 异氟烷下调神经干细胞的 Notch2 (A), Notch3 (B) 受体及靶基因 Hes5 (C) 的 mRNA 水平
Fig.2 Effect of isoflurane on the expression of Notch2 (A), Notch3 (B) and Hes5 (C) in cultured NSCs

3 讨论

异氟烷是临床上常用的吸入麻醉剂之一,可以快速达到临床麻醉所需的遗忘、镇痛、催眠等诸多效果^[1]。但是,近年来的研究对异氟烷的作用出现了争议,一方面,适量的异氟烷在局部脑缺血损伤过程中发挥神经保护作用^[12],另一方面异氟烷不仅会引术后认知功能障碍^[13],还会影响中枢神经的发育,导致婴幼儿或幼龄动物发育期后认知功能下降^[14]。目前的研究表明异氟烷会抑制新生大鼠的海马神经干细胞增殖分化,促使神经元凋亡,影响系统神经发生^[15]。

哺乳动物包括人类内源性的神经干细胞存在于海马齿状回颗粒层下和室管膜下区,出生后的海马神经元对整个生命过程中的海马功能非常重要,研究证实在体内 15%-20% 的海马神经元发生异常就足以对个体的学习记忆功能造成损伤^[16]。脑源性神经营养因子 BDNF 是重要的神经元功能因子,其 mRNA 在大脑皮质和海马区高表达,它可以促进神经元存活和生长,促使受损神经元修复,在中枢神经系统的发展和神经可塑性中起着至关重要的作用^[17,18]。海马神经干细胞功能和 BDNF 表达异常是麻醉剂造成的神经发育障碍的重要原因,并且目前的研究显示,异氟烷影响啮齿类神经干细胞的增殖分化功能,诱导神经干细胞发生凋亡^[15]。此外,还有研究表明,低浓度 (0.7 MAC) 的异氟烷不影响神经干细胞的增殖,但相同或高于全身麻醉剂量 (1.4 MAC, 2.8 MAC, 3.5 MAC) 的异氟烷明显抑制体外培养神经干细胞的增殖,并且这种抑制作用可以在处理后维持至少 24 小时^[19]。本研究发现,1.0 MAC 和 1.5 MAC 两个浓度的异氟都能明显上调体外培养神经干细胞的 Caspase3 mRNA 水平而且抑制 BDNF 的 mRNA 水平,说明异氟烷可能通过抑制神经干细胞的 BDNF 表达促使细胞凋亡影响其正常功能。

Notch 信号通路是神经干细胞发育中的重要调节因子,维持着神经干细胞增殖、分化、凋亡之间的平衡,对神经干细胞细胞分化命运起决定性作用^[9,20]。相邻细胞的配体与 Notch 受体结合后,激活 Notch 信号通路,激活 HES 等靶基因表达,促进神经干细胞增殖,抑制其分化,而抑制 Notch 信号通路会诱导神经干细胞发生凋亡^[21,22]。也有报道称低剂量异氟烷通过激活

Notch 信号通路在脑缺血造成的神经损伤中起保护神经作用,而给予 Notch 信号通路抑制剂 DAPT 处理或者敲除脑缺血模型小鼠的 Notch-RBP-J 基因,异氟烷在该过程中的神经保护作用就会丧失^[23]。此外,有研究表明在脑缺血大鼠模型中激活 Notch 信号通路可以上调海马神经干细胞 BDNF 表达并促进其增殖^[24]。本研究发现,异氟烷不仅影响神经干细胞 BDNF 的 mRNA 水平,还明显抑制了 Notch 信号通路相关受体及靶基因的表达,提示异氟烷对神经干细胞 BDNF 及功能的调控作用可能与 Notch 信号通路相关。

综上所述,本研究发现异氟烷可能通过抑制小鼠神经干细胞的 Notch 信号通路相关基因表达,下调 BDNF 的 mRNA 表达,上调 Caspase3 的 mRNA 水平,影响神经干细胞的正常功能。然而,麻醉剂调控 Notch 受体及靶基因表达的作用机制,以及异氟烷如何通过 Notch 信号调控 BDNF 基因表达和细胞凋亡的机制尚未能解答清楚,还需进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Zhu Chang-lian, Gao Jian-feng, Klas Blomgren, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(5): 1017-1030
- [2] 卢成康. 异氟烷麻醉抑制海马齿状回神经干细胞的增殖及分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(19): 3049-3053
- [3] Lu Cheng-kang. Isoflurane inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells in the dentate gyrus [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(19): 3049-3053
- [4] Weber F, Beek S, Scoones G. Potential neurotoxicity of anesthetic drugs in young children: who cares? A survey among European anesthesiologists [J]. Minerva Anesthesiol, 2016, 82(3): 294-300
- [5] 尹翠, 魏灵山, 孙凌燕, 等. 异丙酚麻醉对新生小鼠海马 c-fos 表达和 caspase-3 激活的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2011, 31(7): 884-886
- [6] Yin Cui, Gou Ling-shan, Sun Ling-yan, et al. Effect of propofol on expression c-fos/Caspase3 in hippocampal of newborn mice [J]. Chin J Anesthesiol, 2011, 31(7): 884-886
- [7] Bercker S, Bert B, Bittigau P, et al. Neurodegeneration in newborn rats following propofol and sevoflurane anesthesia [J]. Neurotox Res, 2009, 16(2): 140-147

- [6] Johnson S A, Young C, Olney J W. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2008, 20(1): 21-28
- [7] Nie H, Peng Z, Lao N, et al. Effects of sevoflurane on self-renewal capacity and differentiation of cultured neural stem cells [J]. Neurochem Res, 2013, 38(8): 1758-1767
- [8] Greg Stratmann, Ran Dai, B.A, et al. Isoflurane Differentially Affects Neurogenesis and Long-term Neurocognitive Function in 60-day-old and 7-day-old Rats [J]. Anesthesiology, 2009, 110(6): 834-848
- [9] Androutsellis-Theotokis A, Soldner F, Hoeppner D J, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo [J]. Nature, 2006, 442(7104): 823-826
- [10] Yang Q, Yan W, Li X, et al. Activation of canonical notch signaling pathway is involved in the ischemic tolerance induced by sevoflurane preconditioning in mice [J]. Anesthesiology, 2012, 117(5): 996-1005
- [11] Zhai W H, Zhao J, Huo S P, et al. Mechanisms of cytotoxicity induced by the anesthetic isoflurane: the role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 6929-6942
- [12] Jinbo Yin, Zhiyi Zuo, et al. Inhibition of Brain Ischemia-Caused Notch Activation in Microglia May Contribute to Isoflurane Postconditioning-Induced Neuroprotection in Male Rats [J]. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2014, 3: 718-732
- [13] Zhang F, Zhu Z Q, Liu D X, et al. Emulsified isoflurane anesthesia decreases brain-derived neurotrophic factor expression and induces cognitive dysfunction in adult rats [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(2): 471-477
- [14] Mazoit J X, P Roulleau, C Baujard. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the neonatal rhesus macaque brain: isoflurane or ischemia-reperfusion [J]. Anesthesiology, 2010, 113(5): 1245-1246
- [15] Culley D J, Boyd J D, Palanisamy A, et al. Isoflurane decreases self-renewal capacity of rat cultured neural stem cells [J]. Anesthesiology, 2011, 115(4): 754-763
- [16] Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, et al. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to up-dating and strengthening of spatial memory [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(14): 5919-5924
- [17] 李莎, 郑洪波, 黄雄, 等. BDNF 或 5HTTLPR 与抑郁症的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 34(12): 6788-6791
- Li Sha, Zheng Hong-bo, Huang Xiong, et al. Research on the Relationship Between BDNF or 5HTTLPR and Depressive Disorder [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 34(12): 6788-6791
- [18] 黎功炳, 雷宁, 龙静, 等. 刺五加胶囊改善抑郁大鼠学习记忆能力及对海马 BDNF 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(6): 1078-1080
- Li Gong-bing, Lei Ning, Long Jing, et al. The Effects of Acanthopanax Senticosus Pill on the Expression of TH and TPH in Hippocampus of Depressed Rats [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(6): 1078-1080
- [19] Sall J W, Stratmann G, Leong J, et al. Isoflurane inhibits growth but does not cause cell death in hippocampal neural precursor cells grown in culture [J]. Anesthesiology, 2009, 110(4): 826-833
- [20] Arevalo MA, Ruiz-Palmero I, Scerbo MJ, et al. Molecular mechanisms involved in the regulation of neurogenesis by estradiol: Recent advances [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 131(1-2): 52-56
- [21] Fujimoto M, Takagi Y, Muraki K, et al. RBP-J promotes neuronal differentiation and inhibits oligodendroglial development in adult neurogenesis [J]. Dev Biol, 2009, 332(2): 339-350
- [22] Greenberg D A, K Jin. Turning neurogenesis up a Notch [J]. Nat Med, 2006, 12(8): 884-885
- [23] Zhang HP, Sun YY, Chen XM, et al. The Neuroprotective Effects of Isoflurane Preconditioning in a Murine Transient Global Cerebral Ischemia-Reperfusion Model: The Role of the Notch Signaling Pathway [J]. NeuroMolecular Medicine, 2013, 16(1): 191-204
- [24] Tao J, Chen B, Gao Y, et al. Electroacupuncture enhances hippocampal NSCs proliferation in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of notch signaling pathway [J]. Int J Neurosci, 2014, 124(3): 204-212

(上接第 10 页)

- [19] Bose S, Panda AK, Mukherjee S, et al. Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system [J]. Cell Div, 2015, 10: 6
- [20] Moore PB, Steitz TA. The involvement of RNA in ribosome function [J]. Nature, 2002, 418(6894): 229-235
- [21] Roussel P, Andre C, Masson C, et al. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle [J]. J Cell Sci, 1993, 104 (Pt 2): 327-337
- [22] Divya CS, Pillai MR. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis [J]. Mol Carcinog, 2006, 45(5): 320-332
- [23] 黄谟婉, 马英. 姜黄素对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2008, (12): 1094-1097
- Huang Mo-wan, Ma Ying. Effect of Curcumin on Proliferation and Apoptosis of HeLa Cells [J]. China Journal of Biologicals, 2008, (12): 1094-1097