

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.005

异氟烷对小鼠星型胶质细胞 Sirt1 和 MAO-A 基因表达的影响 *

何 宏¹ 顾 婷² 薛姗姗¹ 王化宁¹ 彭正午¹ 周翠红^{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:探讨异氟烷对小鼠星形胶质细胞 Sirt1 和 MAO-A 基因表达的影响。**方法:**给予体外培养的新生小鼠原代星形胶质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 (0.5ISO、1.0ISO、1.5ISO), 其中异氟烷组细胞分别给予 0.5 MAC、1.0 MAC 和 1.5 MAC 三个浓度的异氟烷处理 2 小时, 对照组给予 O₂ 处理 2 小时, 然后提取细胞 RNA 和蛋白检测 Sirt1 和 MAO-A 的 mRNA 和蛋白表达变化。**结果:**与对照组相比, 异氟烷下调小鼠星形胶质细胞的 Sirt1 和 MAO-A mRNA 和蛋白水平, 异氟烷浓度越大下调越明显。**结论:**异氟烷可抑制小鼠星形胶质细胞的 Sirt1 和 MAO-A 基因表达。

关键词:异氟烷; 星形胶质细胞; Sirt1; MAO-A

中图分类号:R-33; R74 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)15-2817-04

Effect of Isoflurane on the Expression of Sirt1/MAO-A
in Cultured Astrocytes*HE Hong¹, GU Ting², XUE Shan-shan¹, WANG Hua-ning¹, PENG Zheng-wu¹, ZHOU Cui-hong^{1Δ}

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

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

ABSTRACT Objective: To explore the effect of isoflurane on the expression of Sirt1/MAO-A of Astrocytes. **Methods:** Cultured astrocytes from newborn mice were divided into control and isoflurane groups: control group was treated with O₂ for 2 hours and isoflurane treatment groups (0.5ISO, 1.0ISO, 1.5ISO) were treated with 0.5 MAC, 1.0 MAC and 1.5 MAC of isoflurane for 2 hours respectively. Then total RNA and protein was extracted from cells and the mRNA and protein levels of Sirt1 and MAO-A were measured by Real-time PCR and Western blot respectively. **Results:** (1) Compared with the control, Isoflurane significantly down-regulated the mRNA as well as protein levels of Sirt1 and MAO-A in the cultured astrocytes; (2) The effect of isoflurane revealed a dose effect---compared with 0.5ISO group, cells treated with 1.0MAC and 1.5 MAC of isoflurane suffered more influence. **Conclusion:** Isoflurane exposure suppressed the expression of Sirt1/MAO-A of astrocytes from newborn mice brain, which is important for the isoflurane narcotherapy in depressive.

Key words: Isoflurane; Astrocytes; Sirt1; MAO-A

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R74 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)15-2817-04

前言

抑郁症是目前临床上最常见的精神疾患之一, 其发病率呈逐年上升的趋势, 严重影响人类的健康和生活质量^[1]。1990 年, 世界卫生组织将重型抑郁症定义为世界第四大致残疾病, 其致死率高于缺血性心脏病或者脑血管疾病。异氟烷是临床常用的麻醉剂之一, 有研究表明异氟烷具有抗抑郁作用^[2], 但其作用机制并不清楚。

目前, 对抑郁症发生机制的研究以 5-羟色胺(5-HT)在突触间隙缺乏的假说为主, 临床上的抗抑郁药物也多以此为理论基础, 通过抑制 5-HT 再摄取作用或抑制单胺氧化酶对 5-HT 的氧化进而增加突触间隙 5-HT 的浓度^[3]。异氟烷具有抗抑郁作用, 但其是否参与调控 5-HT 的代谢过程并不清楚。因此, 本研究研究了异氟烷对体外培养小鼠星形胶质细胞的单胺氧化酶

MAO-A 及其上游调控基因去乙酰化酶 Sirt1 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1)细胞培养试剂: DMEM (Hyclone) + 10% FBS (Hyclone); 0.25%胰酶(Gibco); (2)异氟烷: 扬子江药业集团有限公司; (3)基因表达检测试剂: Trizol (Takara, 108-95-2); 反转录试剂盒 (Takara, RR036A); SYBR Premix Ex Taq (Takara, RR820A); 蛋白提取试剂盒 (KeyGEN BioTECH, KGP2100); (4) 抗体: Anti-GFAP antibody (abcam, ab7260); Anti-MAOA antibody (abcam, ab126751); Anti-sirt1 antibody (abcam, ab110304); Beta-Actin antibody (CWbiotech, CW0096); Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 568 conjugate (Invitrogen, A10042); Goat-anti-mouse IgG-HRP (CMCtag, AT0098);

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

作者简介: 何宏, 主治医师, 主要从事精神疾病方面研究, E-mail: hehong715@163.com

Δ 通讯作者: 周翠红, E-mail: zch4610@126.com

(收稿日期: 2016-12-11 接受日期: 2016-12-29)

Goat-anti-rabbit IgG-HRP (CMCtag, AT0097); DAPI (Roche, 10236276001); (5)主要实验仪器:恒温细胞培养箱(Thermo Scientific);荧光显微镜(Leica);PCR 仪(Thermo Scientific);实时定量 PCR 仪(Thermo Scientific PikoReal);电泳槽(Bio.Rad)。

1.2 实验方法

(1)原代星形胶质细胞分离培养:无菌条件下取出新生小鼠大脑,分离皮层和海马,剪碎后转移至含有 F12 培养基的离心管中,用吸管反复吹吸约 12 次,然后静置 3-5 min,取上层细胞悬液用 200 目网筛过滤,收集滤液,接种于多聚赖氨酸包被过的培养瓶中,置于 5% CO₂ 37℃ 恒温箱中培养,48 h 后半量换液,细胞长满(7-10 天)后进行纯化(培养瓶固定在摇床上,240 rpm 摇晃去除上层杂细胞)。

(2)免疫荧光染色:纯化好的细胞用 0.25%胰酶消化,然后接种于玻片上进行培养,细胞长满后去掉培液,PBS 洗 3 次,4%PFA 固定 1 h,PBS 洗 3 次,加一抗 (Anti-GFAP antibody 1:

500),4℃ 孵育 24 h,PBS 洗后加二抗(Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor® 568 1:1000),室温孵育 2 h,然后加 DAPI 染核 30 min,洗后封片,荧光显微镜检测拍照。

(3)异氟烷处理:培养好的细胞分为对照组、0.5ISO、1.0ISO 和 1.5ISO 四组放入密闭试验箱中进行吸醚处理,其中 0.5ISO、1.0ISO 和 1.5ISO 组分别给予 0.5 MAC、1.0 MAC、1.5 MAC 的异氟醚处理 2 h,对照组给予 O₂ 处理 2 h,然后收取细胞样本检测相应指标。

(4)基因表达检测:Trizol 提取 RNA 后,反转录成 cDNA,然后进行实时定量 PCR (Real Time-PCR) 反应,检测 Sirt1 和 MAO-A 基因以及内参基因 GAPDH 的 mRNA 表达情况。RT-PCR 引物由 Takara 公司合成,序列如表 1 所示。使用蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白后,进行 Western blot 检测 Sirt1 和 MAO-A 基因以及内参基因 Actin 的蛋白表达情况。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of Real-time PCR

Gene	Forward	Reverse
Sirt1	GCTGACGACTTCGACGACG	TCGGTCAACAGGAGGTTGTCT
MAO-A	GCCCAGTATCACAGGCCAC	GTCCACATAAGCTCCACCA
GAPDH	CCAATGTGTCCGTCGTGGATCT	GTTGAAGTCGCAGGAGACAACC

1.3 统计学方法

采用 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, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。符合正态分布的观测值之间相关分析采用 Pearson 检验, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠星型胶质细胞鉴定

胶质纤维酸性蛋白 GFAP 是星形胶质细胞的重要标志蛋白,是星形胶质细胞纯化鉴定中常用的指标之一^[4]。本实验对分离培养的新生小鼠星形胶质细胞进行了 GFAP 和 DAPI 免疫荧光染色,在荧光显微镜下观察了细胞形态和标志蛋白 GFAP 的表达。结果如图 1 所示,细胞呈星形,核较大是典型的星形胶质细胞形态,所有细胞均呈 GFAP 表达阳性。说明本实验所获得的细胞是星形胶质细胞且纯度较高,可以用于后续研究。

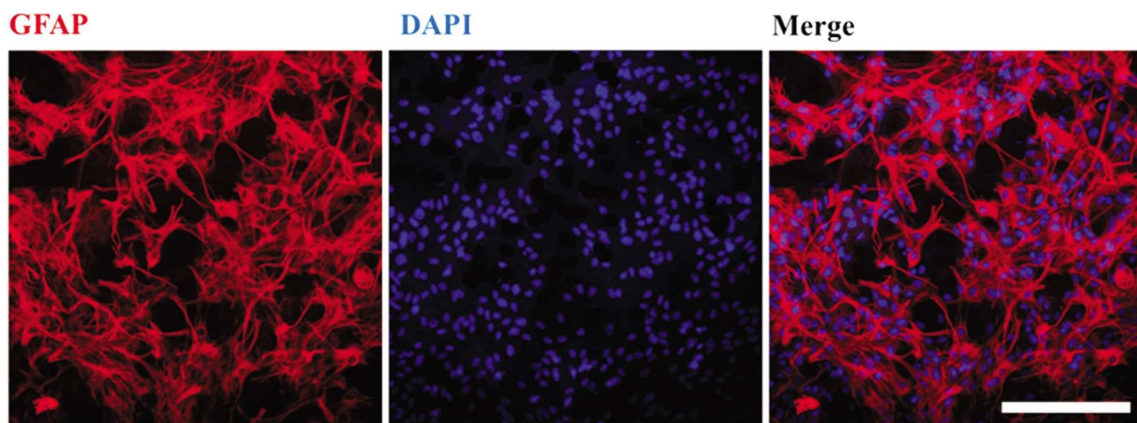


图 1 体外培养星形胶质细胞的形态及 GFAP 表达($\times 200$,标尺 200 μm)

Fig.1 Photomicrographs of Astrocytes in culture ($\times 200$, Bar: 200 μm)

2.2 异氟烷抑制星形胶质细胞 Sirt1 的表达

Sirt1 是 NAD (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 依赖的去乙酰化酶,与抑郁症的发病机制密切相关。本实验研究了异氟醚对小鼠星形胶质细胞 Sirt1 - 表达的影响。结果如图 1 所示,异氟烷抑制星形胶质细胞 Sirt1 表达,且异氟醚浓度越高抑制越明显。与对照组(1.008 ± 0.071)相比,0.5ISO 组细胞的 Sirt1 mRNA 水

平 (0.806 ± 0.066) 稍有下调,但无统计差异;1.0ISO (0.379 ± 0.034) 组和 1.5ISO (0.354 ± 0.043) 的 Sirt1 mRNA 水平明显下调,且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。Western Blot 检测结果显示,Sirt1 的蛋白表达水平与其 mRNA 变化趋势一致。相关性分析显示,在一定的异氟烷浓度范围内,Sirt1 表达水平与异氟烷浓度呈显著的负相关 ($r = 0.872, P < 0.01$)。

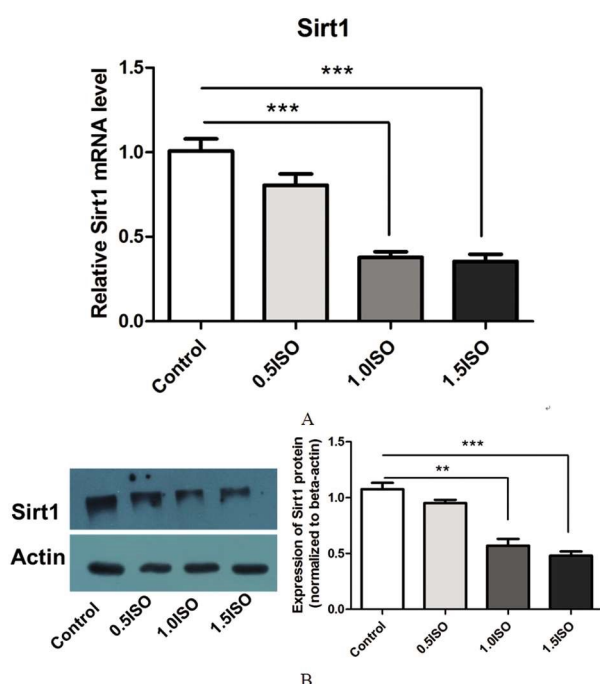


图2 不同浓度异氟醚处理后小鼠星形胶质细胞 Sirt1 基因表达变化
Fig.2 Effect of isoflurane on the expression of Sirt1 in cultured Astrocytes

2.3 异氟烷抑制星形胶质细胞单胺氧化酶 MAO-A 的表达

单胺氧化酶-A(MAO-A)氧化 5-羟色胺(5-HT)使其失活, MAO-A 水平高低直接抑制抑郁症的发病情况。本研究检测了异氟醚对小鼠星形胶质细胞 MAO-A 表达的作用。结果如图 2 所示,异氟醚下调星形胶质细胞 MAO-A 的表达水平,且异氟醚浓度越高下调越明显。与对照组(1.000 ± 0.067)相比,0.5ISO 组细胞的 MAO-A mRNA 水平(0.871 ± 0.063)稍下调,但无统计差异;1.0ISO(0.624 ± 0.053)组 MAO-A mRNA 明显下调,统计差异显著($P < 0.05$),1.5ISO(0.518 ± 0.036)的 MAO-A mRNA 水平下调更为明显,统计差异极显著($P < 0.01$)。Western Blot 检测结果显示,MAO-A 的蛋白表达水平与其 mRNA 变化趋势一致。相关性分析显示在一定的异氟烷浓度范围内,MAO-A 表达水平与异氟醚浓度呈显著的负相关($r = 0.825, P < 0.01$)。

3 讨论

目前抑郁症的发病机制尚不完全清楚,近年来的研究围绕着抑郁症的病因学提出了多种假说,包括神经内分泌假说、神经退行性病变假说、神经营养假说等^[5]。星形胶质细胞不仅在大脑中为神经元提供营养物质,控制着神经元连接强度^[6],还参与微调和重塑大脑的神经回路,在抑郁症的发病机制及治疗过程中发挥重要作用^[7-9]。异氟烷是临床常用的麻醉剂,研究表明其具有一定的抗抑郁效果^[10]。此外,有研究表明给予星形胶质细胞细胞 1.4 MAC 的异氟烷预处理能够减小缺氧无糖对其造成的损伤^[11]。异氟烷是否通过影响星形胶质细胞的功能而发挥其抗抑郁作用尚不清楚。

目前临床常用的抗抑郁药物作用机制,仍然是基于对单胺类递质以及单胺氧化酶的调节作用^[12]。单胺氧化酶有两种亚型,MAO-A 与 MAO-B。MAO-A 对 5-羟色胺和去甲肾上腺素有优先的脱氨基作用,MAO-B 则是针对苯基与苄胺起作用^[13]。MAO-A 在抑郁症的发病机制中具有重要作用,MAO-A 转录

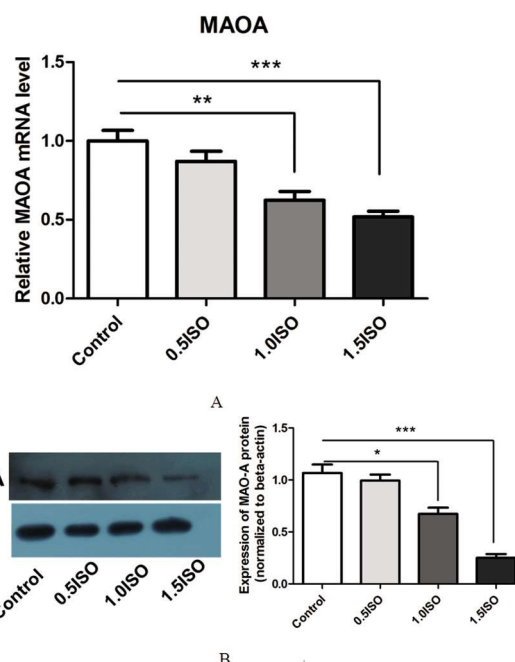


图3 不同浓度异氟醚处理后小鼠星形胶质细胞 MAO-A 基因表达变化
Fig.3 Effect of isoflurane on the expression of MAO-A in cultured Astrocytes

低下会导致中枢神经系统 5-HT 和 NE 水平上调,从而调节与之相关的各种行为^[14]。研究显示抑郁症患者 MAO-A 活性异常^[15],PET 成像也显示 MAO-A 表达减少与男性暴力和攻击行为有关,而抑郁症患者脑内存在 MAO-A 表达上调的现象^[11]。本研究结果显示异氟烷下调了体外培养星形胶质细胞的 MAO-A mRNA 和蛋白水平,异氟烷浓度越高下调越明显,说明异氟烷可能通过影响星形胶质细胞的 MAO-A 水平发挥其生物学功能。

去乙酰化酶 Sirt1 主要在细胞核表达,可以在神经分化和轴突生长、进行性肿瘤和细胞凋亡等情况下转入细胞质。星形胶质细胞也表达 Sirt1^[12]。研究显示 Sirt1 对 NHLH2 (调节 MAO-A 的转录因子) 有去乙酰化作用,可以通过间接调控 MAO-A 的转录进而影响小鼠大脑 5-HT 的代谢和焦虑抑郁样行为^[16],在抑郁症的发病机制中发挥重要作用。本研究结果显示异氟烷下调了体外培养星形胶质细胞的 Sirt1 mRNA 和蛋白水平,异氟烷浓度越高下调越明显,说明异氟烷可能通过影响星形胶质细胞的 Sirt1 水平间接调控单胺氧化酶 MAO-A 的表达影响大脑 5-HT 的代谢而发挥其抗抑郁功能。

综上所述,本研究结果提示异氟烷可能通过下调小鼠星形胶质细胞的去乙酰化酶 Sirt1 的表达,降低单胺氧化酶 MAO-A 水平而发挥其抗抑郁作用。但本研究具有一定的局限性,实验观察到了异氟烷调控体外培养星形胶质细胞的 Sirt1/MAO-A mRNA 和蛋白表达,但未能在体内验证其抗抑郁效果及对大脑 5-HT 水平的影响。此外,异氟烷影响 Sirt1 表达的分子机制也还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Asseburg C, Willis M, Löthgren M, et al. Hospitalisation Utilisation and Costs in Schizophrenia Patients in Finland before and after Initiation of Risperidone Long-Acting Injection [J]. Schizophr Res Treatment, 2012, 2012: 79-80
- [2] Miniussi C, Bonato C, Bignotti S, et al. Repetitive transcranial mag-

- netic stimulation (rTMS) at high and low frequency: an efficacious therapy for major drug-resistant depression [J]. Clin Neurophysiol, 2005, 116(5): 1062-1071
- [3] Kim SW, Chung YC, Lee YH, et al. Paliperidone ER versus risperidone for neurocognitive function in patients with schizophrenia: a randomized, open-label, controlled trial[J]. Int Clin Psychopharmacol, 2012, 27(5): 267-274
- [4] Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation[J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32(5): 619-631
- [5] Wang H, Cheng H, Shao Q, et al. Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling [J]. Biol Reprod, 2014, 90(4): 78
- [6] Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(6): 828-834
- [7] Liu Z, Teng L, Bailey SK, et al. Epithelial transformation by KLF4 requires Notch1 but not canonical Notch1 signaling [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(19): 1840-1851
- [8] Xu P, Qiu M, Zhang Z, et al. The oncogenic roles of Notch1 in astrocytic gliomas in vitro and in vivo [J]. J Neurooncol, 2010, 97(1): 41-51
- [9] 刘文学, 张广芬, 王菁, 等. 星形胶质细胞功能障碍在抑郁症发病中的作用研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(6): 1187-1190
Liu Wen-xue, Zhang Guang-fen, Wang Jing, et al. Progress in Roles of Astrocyte Dysfunction in the Onset of Depression [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(6): 1187-1190
- [10] McEvoy JP, Byerly M, Hamer RM, et al. Effectiveness of paliperidone palmitate vs haloperidol decanoate for maintenance treatment of schizophrenia: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2014, 311(19): 1978-1987
- [11] Xiao X, Ning L, Chen H. Notch1 mediates growth suppression of papillary and follicular thyroid cancer cells by histone deacetylase inhibitors[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(2): 350-356
- [12] Han B, Liu SH, Guo WD, et al. Notch1 downregulation combined with interleukin-24 inhibits invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(33): 9727-9735
- [13] 孙楷, 孙凡, 朱亮. 单胺氧化酶抑制剂在临床方面的应用 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(6): 1180-1182
Sun Kai, Sun Fan, Zhu Liang. The Applications of Monoamine Oxidase Inhibitors in Clinical[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(6): 1180-1182
- [14] Shen S, Sun C'Y, Du XJ, et al. Co-delivery of platinum drug and siNotch1 with micelleplex for enhanced hepatocellular carcinoma therapy[J]. Biomaterials, 2015, 70: 71-83
- [15] Yang Z, Qi Y, Lu C, et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of Notch1 suppresses tumor growth and enhances the effect of IL-2 immunotherapy in malignant melanoma [J]. J BUON, 2015, 20(6): 1553-1564
- [16] Su Y, Yu L, Liu N, et al. PSMA specific single chain antibody-mediated targeted knockdown of Notch1 inhibits human prostate cancer cell proliferation and tumor growth [J]. Cancer Lett, 2013, 338(2): 282-291
- (上接第 2807 页)
- [13] Ysselstein D, Joshi M, Mishra V, et al. Effects of impaired membrane interactions on α -synuclein aggregation and neurotoxicity [J]. Neurobiol Dis, 2015, pii:S0969-9961(15)00154-0
- [14] Blaabjerg M, Fang L, Zimmer J, et al. Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents [J]. Exp Neurol, 2003, 183(2): 573-580
- [15] Hashimoto M, Masliah E. Alpha-Synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease[J]. Brain Pathol, 1999, 9(4): 707-720
- [16] Wu LY, Bao XQ, Pang HY, et al. FLZ attenuates learning and memory deficits via suppressing neuroinflammation induced by LPS in mice [J]. J Asian Nat Prod Res, 2015, 17(3): 306-317
- [17] Reisine TD, Yamamura HI, Bird ED, et al. Pre-and postsynaptic neurochemical alterations in Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 1978, 159(2): 477-481
- [18] Perry EK, Irving D, Kerwin JM, et al. Cholinergic transmitter and neurotrophic activities in Lewy body dementia: similarity to Parkinson's and distinction from Alzheimer disease[J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1993, 7(2): 69-79
- [19] Cui Z, Feng R, Jacobs S, et al. Increased NR2A: NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1036
- [20] Hanson JE, Pare JF, Deng L, et al. Altered GluN2B NMDA receptor function and synaptic plasticity during early pathology in the PS2APP mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2015, 74: 254-262
- [21] Wang Q, Li J, Wei X, et al. Alterations of NMDA receptor binding in various brain regions among 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats[J]. Int J Neurosci, 2014, 124(6): 457-465