

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.17.004

TLR4-NF κ B-P38 及 CCR5-IP3 信号通路对丙泊酚药物依赖大鼠胶质细胞神经免疫的影响*

阿勒西尔·努尔买买提 王 婷 努尔买买提江·买合木提[△] 苏丽亚·迪力夏提 郑 敏

(新疆医科大学附属肿瘤医院麻醉与围术期医学中心 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:探讨 Toll 样受体 4(TLR4)-核因子 κ B(NF κ B)-P38 及 C-C 趋化因子受体 5(CCR5)-(三磷酸肌醇)IP3 信号通路对丙泊酚药物依赖大鼠胶质细胞神经免疫的影响。**方法:**体外实验:使用细胞计数试剂-8(CCK-8)试剂盒检测并比较丙泊酚药物依赖对 BV2(小鼠小胶质细胞)细胞活性的影响;流式细胞术比较丙泊酚药物依赖对 BV2 细胞凋亡率的影响;比较不同浓度丙泊酚对 BV2 细胞因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、趋化因子配体 2(CCL2)和 CCL5]的影响。采用免疫蛋白印记法(WB)检测并比较 TLR4、p65、磷酸化-p65(p-p65)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达。动物实验:利用 24 只 SD 大鼠建立丙泊酚药物依赖模型分为三组:空白组(注射等量生理盐水, n=8),丙泊酚药物依赖模型组(注射 40 mg/kg 丙泊酚+生理盐水, n=8),异丁司特(IBU)预处理+丙泊酚干预组(注射 7.5 mg/kg IBU, n=8)。采用条件性位置偏爱(CPP)和移动距离评估丙泊酚所致的成瘾效应。检测并比较 SD 大鼠模型血清细胞因子(CCL2、CCL5 和 TNF- α)水平以及前额叶皮质组织中相关蛋白表达。**结果:**与空白组比较,丙泊酚 15 μ M 干预组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平升高($P<0.05$);丙泊酚 20 μ M 干预组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平升高($P<0.05$)。与空白组比较,丙泊酚干预组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平升高($P<0.05$),与丙泊酚干预组对比,IBU 预处理+丙泊酚干预组的 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平显著下降($P<0.05$)。与空白组比较,丙泊酚干预组和 IBU 预处理+丙泊酚干预组的 TLR4 蛋白表达显著增加, p-p65 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著上调($P<0.05$),而 p65 和 ERK1/2 的蛋白表达变化差异无统计学意义($P>0.05$)。与丙泊酚干预组比较,IBU 预处理+丙泊酚干预组 TLR4、p-p65 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与空白组比较,丙泊酚干预组 CPP 值显著升高($P<0.05$),与丙泊酚干预组比较,IBU 预处理+丙泊酚干预组 CPP 值显著降低($P<0.05$)。与空白组比较,丙泊酚干预组的移动距离组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$);与丙泊酚干预组比较,IBU 预处理+丙泊酚干预组也表现出降低移动距离趋势($P<0.05$)。在大鼠前额叶皮质组织中,与空白组比较,丙泊酚干预组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平显著增加($P<0.05$)。与丙泊酚干预组比较,IBU 预处理+丙泊酚干预组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平显著降低($P<0.05$)。与空白组比较,丙泊酚干预组前额叶皮质组织中 TLR4 蛋白表达、p-p65、p-ERK1/2 显著升高($P<0.05$)。与丙泊酚干预组比较,IBU 预处理+丙泊酚干预组的前额叶皮质组织中 TLR4 蛋白表达、p-p65、p-ERK1/2 显著降低($P<0.05$)。**结论:**TLR4-NF κ B-P38 及 CCR5-IP3 信号通路可能参与神经免疫调节在丙泊酚药物依赖中的作用。

关键词:丙泊酚;精神依赖;神经免疫系统;CCR5-IP3 信号通路;TLR4-NF κ B-P38 信号通路

中图分类号:R-33;R965 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)17-3217-09

Effects of TLR4-NF κ B-P38 and CCR5-IP3 Signaling Pathways on Neuroimmunity of Glial Cells in Propofol-Dependent Rats*

Alexir·Nuermaimaiti, WANG Ting, Nuermaimaitijiang·Maihemit[△], Sulia·Dilixiati, ZHENG Min
(Anesthesia and Perioperative Medical Center, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University,
Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objectives: To investigate the effects of Toll-like receptor 4 (TLR4) -nuclear factor κ B (NF κ B)-P38 and C-C chemokine receptor 5 (CCR5)- (inositol triphosphate) IP3 signaling pathways on the neuroimmunity of glial cells in propofol-dependent rats. **Methods:** In vitro experiments: the effect of propofol drug dependence on BV2 (mouse microglia) cell activity were detected and compared by cell counting kit-8 (CCK-8) kit. The effect of propofol drug dependence on the apoptosis rate of BV2 cells were compared by flow cytometry. The effects of different concentrations of propofol on BV2 cytokines [tumor necrosis factor- α (TNF- α), chemokine ligand 2 (CCL2) and CCL5] were compared. The expressions of TLR4, p65, phosphorylated-p65 (p-p65), extracellular regulated protein kinase (ERK) 1/2 and p-ERK1/2 were detected and compared by Western blot (WB). Animal experiments: 24 SD rats were used to establish a propofol drug dependence model and divided into three groups: blank group (injected with the same amount of normal saline, n=8), propofol drug dependence model group (injected with 40 mg/kg propofol and normal saline, n=8), isobuprost (IBU)

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C390)

作者简介:阿勒西尔·努尔买买提(1993-),男,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:麻醉药物依赖,E-mail: 19990309130@163.com

[△] 通讯作者:努尔买买提江·买合木提(1977-),男,硕士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:麻醉药物依赖,E-mail: 914677751@qq.com

(收稿日期:2024-03-03 接受日期:2024-03-26)

pretreatment+propofol intervention group (injected with 7.5 mg/kg IBU, n=8). The addictive effect of propofol were evaluated by conditioned place preference (CPP) and moving distance. The levels of serum cytokines (CCL2, CCL5 and TNF- α) and the expression of related proteins in prefrontal cortex of SD rat model were detected and compared. **Results:** Compared with blank group, the levels of CCL2, CCL5 and TNF- α in propofol 15 μ M intervention group were increased ($P<0.05$). The levels of CCL2, CCL5 and TNF- α in propofol 20 μ M intervention group were increased ($P<0.05$). Compared with blank group, the levels of CCL2, CCL5 and TNF- α in propofol intervention group were increased ($P<0.05$), compared with propofol intervention group, the levels of CCL2, CCL5 and TNF- α in IBU pretreatment+propofol intervention group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with blank group, the expression of TLR4 protein in propofol intervention group and IBU pretreatment+propofol intervention group was significantly increased, and the expression of p-p65 and p-ERK1/2 protein was significantly up-regulated ($P<0.05$), there was no significant difference in the expression of p65 and ERK1/2 protein ($P>0.05$). Compared with propofol intervention group, the expression of TLR4, p-p65 and p-ERK1/2 protein in IBU pretreatment+propofol intervention group was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with blank group, the CPP value in propofol intervention group was significantly increased ($P<0.05$), compared with propofol intervention group, the CPP value in IBU pretreatment+propofol intervention group was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with blank group, the difference in the moving distance between propofol intervention group and blank group was statistically significant ($P<0.05$). Compared with propofol intervention group, the IBU pretreatment+propofol intervention group also showed a tendency to reduce the moving distance ($P<0.05$). In the frontal cortex of rats, compared with blank group, the levels of CCL2, CCL5 and TNF- α in propofol intervention group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with propofol intervention group, the levels of CCL2, CCL5 and TNF- α in IBU pretreatment+propofol intervention group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with blank group, the expression of TLR4 protein, p-p65 and p-ERK1/2 in prefrontal cortex of the propofol intervention group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with propofol intervention group, the expression of TLR4 protein, p-p65 and p-ERK1/2 in prefrontal cortex of the IBU pretreatment+propofol intervention group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** TLR4-NF κ B-P38 and CCR5-IP3 signaling pathways may be involved in the role of neuroimmune regulation in propofol drug dependence.

Key words: Propofol; Psychological dependence; Nervous immune system; C-C chemokine receptor 5-IP3 signaling pathways; Toll-like receptor 4 -nuclear factor κ B-P38 signaling pathways

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R965 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)17-3217-09

前言

药物依赖会影响奖赏、动机、记忆和相关的大脑系统,因此也称为药物成瘾^[1]。病态的成瘾易形成处方药的滥用、成瘾和吸毒等有害行为而无法控制,导致严重的身心问题和社会危害^[2]。丙泊酚是目前临床上广泛应用于镇静的麻醉药物。相关研究证实,大鼠实验中丙泊酚具有自我给药和条件位置偏好的药物滥用潜力标志^[3]。不仅临床医师偏向使用丙泊酚镇静,且普通人群常用作娱乐性药物^[4],提示丙泊酚滥用可能产生依赖性并增加死亡风险。相关研究发现,神经免疫系统参与药物成瘾的密切相关,胶质细胞对许多滥用药物如酒精、可卡因和阿片类药物的积极反应都是通过产生亚炎症免疫反应产生^[5],这种反应通过细胞因子和趋化因子作用于邻近的神经元来诱导突触功能的改变,影响神经元对信息的处理^[6]。同时滥用药物可直接或间接地与免疫受体相互作用。Toll样受体4(TLR4)可与酒精、可卡因和阿片类药物结合。TLR4激活最终导致核因子 κ B(NF κ B)等代表性炎症转录因子移位到细胞核,并释放炎症介质[趋化因子配体2(CCL2)、白细胞介素(IL)-6和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)]^[7,8]。CCL2释放与CCR2+神经元结合,反过来改变细胞膜超极化和ERK1/2磷酸化,最终影响神经传递^[9]。相关证据表明,趋化因子在成瘾过程中存在密切的相互作用^[10],其中CCL5与CCR5结合可促进炎症表达^[11],CCL5的长期升高可能会使神经元和胶质细胞上的 μ 阿片受体敏感,使个体产生

耐受和快感丧失,最终导致成瘾^[12,13]。大量的行为学研究认为神经免疫系统与动物和人类的成瘾表型有关。异丁司特(IBU)是一种胶质细胞激活的抑制剂,可阻断啮齿动物体内阿片类药物的自我给药^[4]。研究证实,与安慰剂或对照组相比,IBU成功地减少了阿片类药物的戒断表现^[15]。因此,本研究探讨TLR4-NF κ B-P38及CCR5-IP3信号通路对丙泊酚药物依赖大鼠胶质细胞神经免疫的影响,报道如下。

1 材料与仪器

1.1 细胞

BV2(小鼠小胶质细胞)来源于武汉普诺赛生命科技有限公司,在DMEM培养基培养,培养温度为37 $^{\circ}$ C,CO₂浓度为5%。

1.2 动物

24只6-8周龄的SPF级SD大鼠来源于新疆医科大学。生产许可证号为:SCXK(新)2023-0001,使用许可证号为:SYXK(新)2023-0004。5天适应环境后在室温23 \pm 3 $^{\circ}$ C,相对湿度40%-70%的新疆医科大学医学实验动物中心饲养。

1.3 试剂

细胞计数试剂-8(CCK-8)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,货号:FC101-03)、CCL2、CCL5、TNF- α 酶联免疫吸附实验试剂盒(ELISA Kit,杭州联科生物技术股份有限公司,货号:EK287/2、EK2129/2、EK282/4)、DMEM培养基(美国Gibco

公司,货号:C11330500BT)、Ibutilast(阿拉丁生化科技股份有限公司,货号:S4837)、丙泊酚(sigma公司,货号:D126608)、Annexin V PE/7AAD Kit(美国BD公司,货号:559763)、Easy II Protein Quantitative Kit(BCA,北京全式金生物技术有限公司,货号:DQ111-01)、放射免疫沉淀法裂解液、蛋白酶抑制剂(武汉博士德生物工程有限公司,货号:AR0105、AR1178)、山羊抗兔 IgG H&L、山羊抗小鼠 IgG H&L(英国 Abcam 公司,货号:ab205718、ab205719)、SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate(美国 Thermo Fisher 公司,货号:34580)、beta-Actin Loading Control antibody Mouse MAb(北京义翘神州科技股份有限公司,货号:100166-MM10)、重组 Anti-NF- κ B p65(phospho S536)抗体、重组 Anti-NF- κ B p65 抗体、Anti-ERK1 + ERK2 抗体、Anti-ERK1 (phospho T202) + ERK2 (phospho T185) 抗体(英国 abcam 公司,货号:ab76302、ab32536、ab184699、ab201015)、TLR4 Antibody(澳大利亚 Affinity Biosciences 公司,货号:AF7017)、舒泰 50(法国维克公司,货号:8SKGA)、盐酸赛拉嗪注射液(圣达动物药品有限公司,货号:20220301)、甲醛(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号:F809702)。

1.4 仪器

酶标仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:xMark™)、荧光倒置显微镜(日本尼康公司,型号:Eclipse TS100-F)、流式细胞仪(桂林优利特医疗电子有限公司,型号:BF700)、化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:Chemiscope 3000)。

1.5 体外实验

1.5.1 干预方式设计 报告表明,在麻醉诱导和维持过程中,脑内的丙泊酚浓度低于 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($50 \mu\text{M}$)^[9]。为模拟临床丙泊酚滥用和依赖性,我们选择了 $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $15 \mu\text{M}$ 和 $20 \mu\text{M}$ 的丙泊酚。取对数生长期的 BV2 细胞,平均分为 5 组,分别为空白组,丙泊酚不同浓度组 ($5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $15 \mu\text{M}$ 、 $20 \mu\text{M}$),干预方式为干预 2 h,撤药 2 h,3 循环,第三循环药物干预结束后收集样本,总干预时间 10 h,干预结束后检测相关指标。确定丙泊酚浓度后,再分别设计空白组,丙泊酚干预组 ($20 \mu\text{M}$),IBU 预处理 + 丙泊酚干预组(丙泊酚干预前 1 h 干预)进行后续实验,丙泊酚干预方式为干预 2 h,撤药 2 h,3 循环,第三循环药物干预结束后收集样本,干预时间 11 h 后备用于检测相关指标。

1.5.2 CCK-8 试剂盒测定 BV2 细胞增殖 将 BV2 细胞按 5×10^4 cells/mL 接种于孔板中 ($100 \mu\text{L}/\text{孔}$),制备成单细胞悬液,按照步骤 1.5.2 进行分组及干预,每组重复 3 次,处理 6 小时后,检测不同浓度丙泊酚对胶质细胞的增殖率及 IBU 预处理后细胞活性变化,循环干预后的增殖率通过 CCK-8 试剂盒测定。

1.5.3 ELISA 测定细胞因子 将 BV2 细胞按 5×10^4 cells/mL 接种于孔板中 ($500 \mu\text{L}/\text{孔}$),按 1.5.2 干预方式进行干预,每组重复 3 次。干预完成后,收集各组细胞上清液。采用 ELISA 法检测各组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 细胞因子水平。

1.5.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 使用 $20 \mu\text{M}$ 的丙泊酚三次循环处理 BV2 细胞 6 小时,采用流式细胞术检测细胞凋亡率。每组 BV2 细胞经过处理使用胰蛋白酶消化后再收集。按步骤 1.5.2 干预后,BV2 细胞悬浮液用冷磷酸盐缓冲液洗涤、重悬,在 Annexin V-PE 和 7-AAD 标记后使用流式细胞仪分析 BV2 细胞的凋亡率。

1.5.5 免疫蛋白印迹(WB)法蛋白表达检测 收集 BV2 细胞,如步骤 1.5.2 干预各组。按照 WB 法检测 TLR4、p65、p-p65、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平。

1.6 动物实验

1.6.1 试剂配制 混合麻醉剂:将 250 mg 舒泰 50 与 2.5 mL 盐酸赛拉嗪注射液 ($100 \text{mg}/\text{mL}$) 混合,使用 22.5 mL 无菌生理盐水稀释成舒泰 50 ($10 \text{mg}/\text{mL}$) + 盐酸赛拉嗪注射液 ($10 \text{mg}/\text{mL}$) 混合溶液后备用。

10%中性甲醛:使用 $1 \times$ 磷酸盐缓冲液将甲醛溶液浓度稀释至 10%, 4°C 保存备用。

IBU 干预剂:异丁司特与生理盐水混合,制备成浓度 $25 \text{mg}/\text{mL}$ 溶液于 4°C 保存备用。

1.6.2 药物依赖行为模型建立 有条件的位置偏好 (CPP) 是一种标准的行为模型,用于评估药物的奖励价值^[7]。行为实验步骤参考文献^[8]。如果模型组测试结果中, CPP 和伴药箱活动距离跟空白组比较有显著差异,则认为模型建立成功。计算公式如下: $\text{CPP} = \text{大鼠在伴药区停留时间} - \text{非伴药区的停留时间}$ 。

1.6.3 分组及干预 将 24 只 SD 大鼠主要分为 3 组,分为空白组、丙泊酚干预组和 IBU 预处理 + 丙泊酚干预组,每组 8 只。实验共有三个阶段。包括预试阶段(3 天)进行基线检测、给药训练阶段(14 天)和测试阶段(1 天)。给药训练阶段中,测试箱两箱之间的通道关闭,空白组每天给与生理盐水腹腔注射作对照;丙泊酚干预组分为奇数偶数天给与不同药物干预,在伴药箱中采用偶数天腹腔注射 $40 \text{mg}/\text{kg}$ 丙泊酚,在非伴药箱于奇数天注射生理盐水;IBU 预处理 + 丙泊酚干预组则在丙泊酚注射前 30 分钟腹腔注射 $7.5 \text{mg}/\text{kg}$ IBU 进行干预,其余操作同丙泊酚干预组。

1.6.4 样本收集 实验结束后,处死所有 SD 大鼠。血清样本:收集腹腔动脉血,分离血清样本,在 -80°C 冰箱保存;前额叶皮质组织:收集大鼠前额叶皮质组织,平均分为两份,一份使用甲醛固定,另一份使用液氮速冻后在 -80°C 冰箱保存。

1.6.5 ELISA 细胞因子水平检测 取 1.6.4 收集的血清样本,ELISA 试剂盒检测各组干预的上清液中 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平。

1.6.6 WB 蛋白表达检测 取大鼠前额叶皮质组织样本进行裂解。按照 WB 法检测 TLR4、p65、p-p65、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 26.0 进行统计学分析。计量资料以均值 \pm 标准差表示。定量结果使用 GraphPad Prism 8 两组间的比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表明有显著性差异。

2 结果

2.1 丙泊酚药物依赖对 BV2 细胞活性的影响

丙泊酚浓度为 5 、 10 、 15 和 $20 \mu\text{M}$ 干预下 BV2 细胞存活率组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);使用 $20 \mu\text{M}$ 丙泊酚处理后,细胞存活率出现下降趋势。因此,选择 $20 \mu\text{M}$ 丙泊酚作为药物依赖浓度。采用胶质细胞激活的抑制剂 IBU 预处理组后, $20 \mu\text{M}$ 丙泊酚处理的细胞存活率具有一定的提升,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这表明持续暴露于丙泊酚可能会对细胞存活率产生负面影响。见图 1、2。

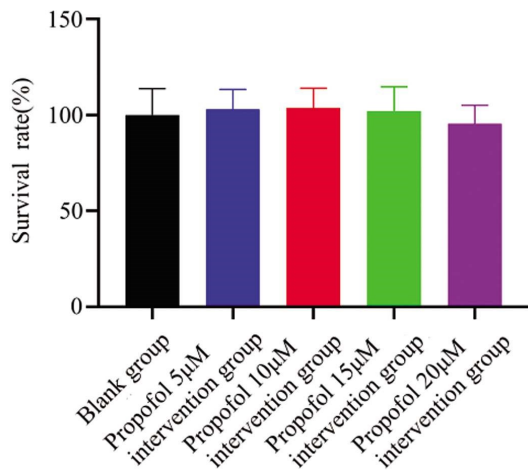


图 1 不同浓度丙泊酚对 BV2 细胞增殖的影响

Fig. 1 The effect of different concentrations of propofol on BV2 cell proliferation

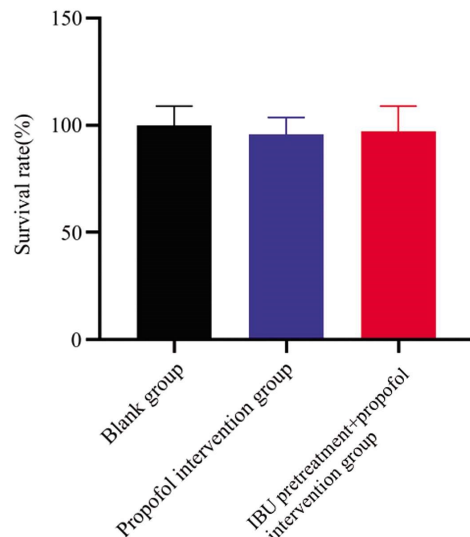


图 2 丙泊酚药物依赖对 BV2 细胞增殖的影响

Fig. 2 The effect of propofol drug dependence on BV2 cell proliferation

2.2 丙泊酚药物依赖对 BV2 细胞凋亡的影响

与空白组比, 丙泊酚干预组细胞凋亡率一定程度增加, 但比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。丙泊酚干预组与 IBU 预处理 + 丙泊酚干预组的细胞凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这表明持续暴露于丙泊酚可能不会诱导 BV2 细胞凋亡。见图 3。

2.3 丙泊酚药物依赖对细胞因子的影响

与空白组比较, 丙泊酚 15 µM 干预组 CCL2、CCL5 和 TNF-α 水平升高 ($P < 0.05$); 丙泊酚 20 µM 干预组 CCL2、CCL5 和 TNF-α 水平升高 ($P < 0.05$)。确定丙泊酚 20 µM 干预组为药物依赖剂量后, 与空白组比较, 丙泊酚干预组 CCL2、CCL5 和 TNF-α 水平升高 ($P < 0.05$), 与丙泊酚干预组对比, IBU 预处理 + 丙泊酚干预组的 CCL2、CCL5 和 TNF-α 水平显著下降 ($P < 0.05$)。见表 1, 见图 4。

2.4 丙泊酚药物依赖对相关蛋白表达的影响

在丙泊酚 20 µM 诱导下, 与空白组比较, 丙泊酚干预组和 IBU 预处理 + 丙泊酚干预组的 TLR4、p-p65 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$), 而 p65 和 ERK1/2 的蛋白表达变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与丙泊酚干预组比较, IBU 预处理 + 丙泊酚干预组 TLR4、p-p65 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。上述结果显示, TLR4-NFκB-P38 及 CCR5-IP3 信号通路可能通过上调胶质细胞免疫反应导致炎症介质的释放从

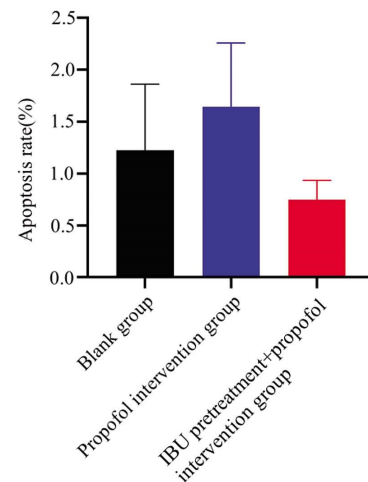


图 3 丙泊酚药物依赖对 BV2 细胞凋亡率的影响

Fig.3 The effect of propofol drug dependence on the apoptosis rate of BV2 cells

而影响丙泊酚药物的依赖程度。见图 5。

2.5 丙泊酚药物依赖对大鼠成瘾行为学表现的影响

与空白组比较, 丙泊酚干预组 CPP 值显著升高 ($P < 0.05$), 与丙泊酚干预组比较, IBU 预处理 + 丙泊酚干预组 CPP 值显著降低 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 丙泊酚干预组的移动距离组

表 1 丙泊酚不同浓度对细胞上清液中 CCL2、CCL5 和 TNF-α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Different concentrations of propofol on CCL2, CCL5, and TNF in cell supernatant-α Horizontal comparison ($\bar{x} \pm s$)

Group	CCL2 (ng/mL)	CCL5 (ng/mL)	TNF-α (pg/mL)
Blank group	36.48±1.25	2.77±0.48	347.47±39.01
Propofol 5 µM intervention group	36.36±3.12	2.80±0.47	345.31±30.56
Propofol 10 µM intervention group	41.13±3.61	4.45±0.98	377.30±29.26
Propofol 15 µM intervention group	49.99±5.45 ^{*#&}	5.12±0.38 ^{*#&}	429.31±27.77 ^{*#&}
Propofol 20 µM intervention group	59.63±5.38 ^{*#&@}	8.98±0.72 ^{*#&@}	591.50±17.10 ^{*#&@}

Note: Compared with the blank group, ^{*} $P < 0.05$; compared with propofol 5 µM intervention group, [#] $P < 0.05$; compared with propofol 10 µM intervention group, [&] $P < 0.05$; compared with the propofol 15 µM intervention group, [@] $P < 0.05$.

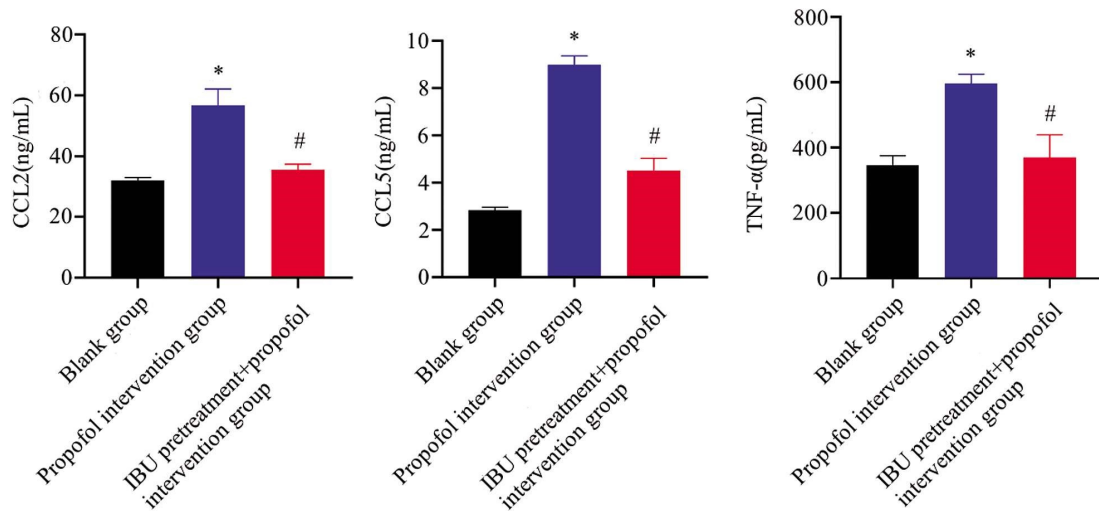


图 4 丙泊酚药物依赖对 BV2 细胞中 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平影响

Fig. 4 Propofol drug dependence on CCL2, CCL5 and TNF- α levels in BV2 cells influence

Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, compared with the propofol intervention group, # $P < 0.05$.

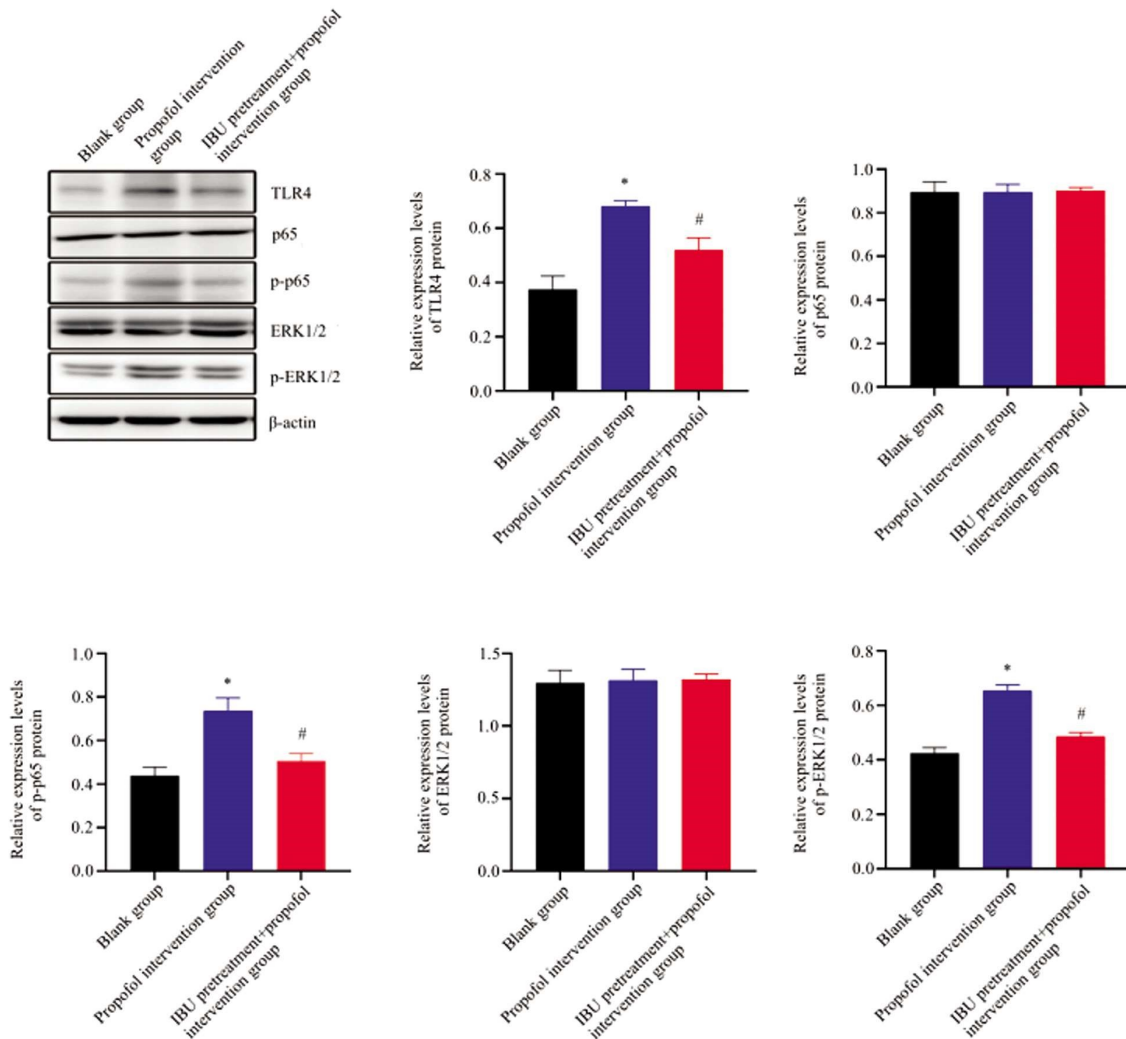


图 5 丙泊酚药物依赖对 BV2 细胞中 TLR4、p65、p-p65、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达的影响

Fig. 5 The effects of propofol drug dependence on TLR4, p65, p-p65, ERK1/2 and p-ERK1/2 protein expression in BV2 cells

Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, compared with the propofol intervention group, # $P < 0.05$.

间比较差异具有统计学意义($P<0.05$),与丙泊酚干预组比较, IBU 预处理 + 丙泊酚干预组也表现出降低移动距离趋势($P<0.$

05)。说明丙泊酚滥用可能引发大鼠精神依赖。见图 6、7。

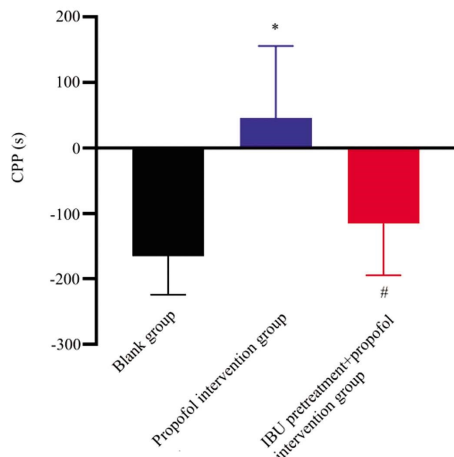


图 6 丙泊酚药物依赖对大鼠 CPP 值的影响(n=8)

Fig. 6 The effect of propofol drug dependence on CPP values in rats (n=8)

Note: Compared with the blank group, * $P<0.05$, compared with the propofol intervention group, # $P<0.05$.

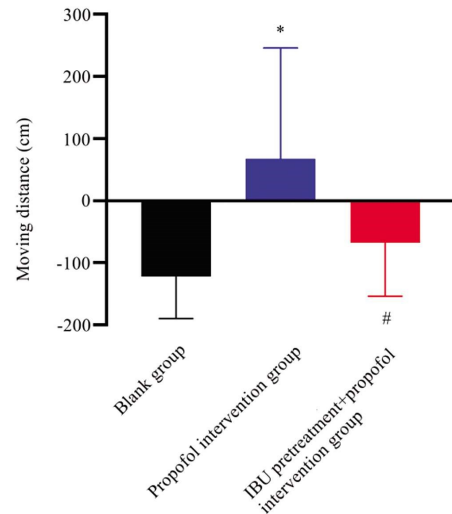


图 7 丙泊酚药物依赖对大鼠移动距离影响(n=8)

Fig.7 The effect of propofol drug dependence on the moving distance of rats (n=8)

Note: Compared with the blank group, * $P<0.05$, compared with the propofol intervention group, # $P<0.05$.

2.6 丙泊酚药物依赖对大鼠组织中细胞因子的影响

在大鼠前叶额皮质组织中,与空白组比较,丙泊酚干预组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平显著增加($P<0.05$)。与丙泊酚干预组比较,IBU 预处理 + 丙泊酚干预组 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平显著降低($P<0.05$)。见图 8。

2.7 丙泊酚药物依赖对大鼠组织中相关蛋白表达的影响

与空白组比较,丙泊酚干预组前额叶皮质组织中 TLR4、p-p65 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与丙泊酚干预组比较,IBU 预处理 + 丙泊酚干预组的前额叶皮质组织中 TLR4、p-p65 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。见图 9。

3 讨论

丙泊酚是广泛用作短效静脉内麻醉剂,然而越来越多证据表明,丙泊酚存在被滥用和产生依赖性的潜在风险。早期临床

研究显示,医疗保健专业人员中丙泊酚滥用的发生率正在增加^[9]。相关研究发现丙泊酚依赖与酒精、可卡因、尼古丁等其他成瘾物质作用和风险相似,可显著影响中枢免疫成分控制药物依赖行为。本研究通过体内、体外两种实验方法进一步探究丙泊酚的精神依赖机制,以期寻找新的治疗丙泊酚精神依赖的方法。

研究证实,胶质细胞是大脑中主要的免疫细胞,重复的给药周期通过释放小胶质细胞促炎细胞因子及其代谢产物,导致进行性、持续性的神经炎症诱导,从而调节神经元功能而导致药物的成瘾^[20]。酒精、吗啡能够增加小胶质细胞和星形胶质细

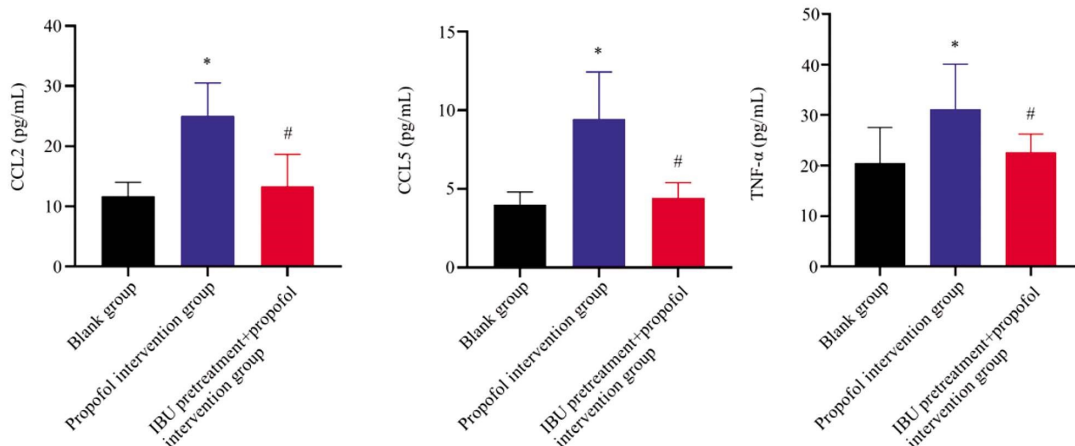


图 8 丙泊酚药物依赖对大鼠组织中 CCL2、CCL5 和 TNF- α 的影响(n=8)

Fig.8 The effect of propofol drug dependence on CCL2, CCL5 and TNF- α in rat tissues (n=8)

Note: Compared with the blank group, * $P<0.05$, compared with the propofol intervention group, # $P<0.05$.

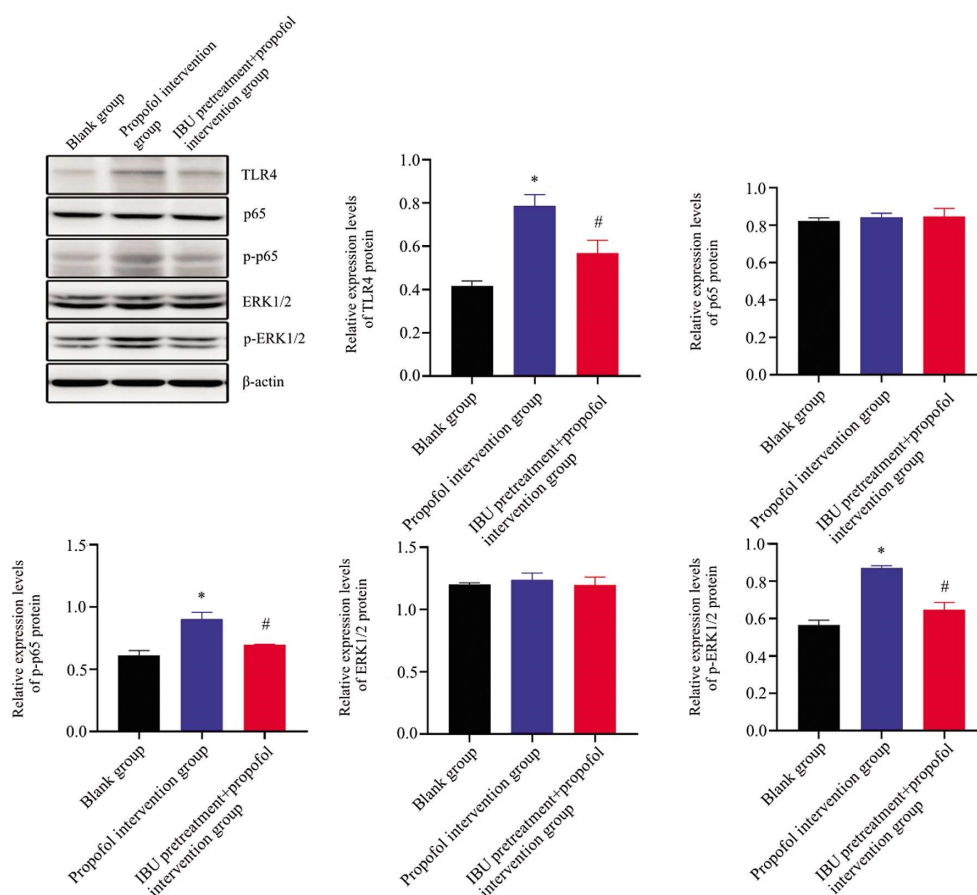


图9 丙泊酚药物依赖对组织中 TLR4、p65、p-p65、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平影响(n=8)

Fig. 9 The effects of propofol drug dependence on TLR4, p65, p-p65, ERK1/2 and p-ERK1/2 protein expression levels in prefrontal cortex tissues (n=8)

Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, compared with the propofol intervention group, # $P < 0.05$.

胞原代培养的促炎介质 CCL2 和 TNF- α 的释放,增加 CCL2 和 CCL5 诱导蛋白的表达^[14,21]。其中 CCL2 介导细胞增殖和凋亡过程^[22]。研究显示,丙泊酚可能通过抑制小胶质细胞外泌体的释放抑制其激活及炎症产生^[23]。本研究结果显示,20 μM 丙泊酚药物依赖对胶质细胞存活率和凋亡具有显著的影响,重复使用高剂量丙泊酚可能会抑制小胶质细胞活性,诱导细胞毒性。并且 20 μM 丙泊酚干预显著上调 CCL2、CCL5 和 TNF- α 细胞因子的水平,使用 IBU 进行预处理后可显著逆转其上调,与前文研究结果一致^[23]。

多项研究表明,滥用药物在 TLR 下游产生的细胞因子和趋化因子会影响成瘾过程中重要的神经可塑性过程,尤其 TLR4 广泛参与药物成瘾行为^[24]。NF- κB 作为 TLR4 下游靶信号,在神经元功能中起到重要作用^[25]。研究发现,TLR4/NF- κB p65 通路可调节上游通路 CCL2、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平^[26]。本研究结果显示,丙泊酚干预下 TLR4、p-p65 和 p-ERK1/2 蛋白表达明显提高。表明 TLR4-NF κ B-P38 在上调神经免疫炎症后,促使包括趋化因子在内的多种因子向下游激活,其中 CCL5 与 CCR5 结合共同促进炎症反应^[27]。星形胶质细胞对进行的神经元活动敏感,通过几种神经胶质递质的上下文相关释放来调节神经元功能。已有研究证实操纵星形胶质细胞消耗 IP3R2 导致 GPCR-Ca²⁺ 信号减少和突触可塑性受损,同时增强 IP3R-Ca²⁺ 信号会影响认知功能,例如学习和记忆、睡眠和情绪^[28]。CCR5 又表现出 G 蛋白信号偏向性,某些趋化因子类

似物可导致转换为 Gq 通路以诱导 Ca²⁺ 信号^[29]。神经系统中,当动作电位到达终扣,启动突触传递,信息得以从一个神经元跨越突触间隙传递到下一个神经元,动作电位也引起离子通道开启,允许钙离子进入终扣。特别是钙离子的流入引起突触囊泡的破裂,释放出它们所含的神经递质。研究证实,趋化因子和阿片类药物的相关分泌释放导致三磷酸腺苷释放,促进 Ca²⁺ 信号传导,从而介导神经递质活动^[30,31]。星形胶质细胞 Ca²⁺ 内流的急性诱导导致行为麻痹的快速发作和神经元活动的抑制^[32]。神经元的轴突中存在肌醇三磷酸(IP3)受体,又是独特的 Ca²⁺ 通道,抑制动作电位放电并增加神经递质的释放^[33]。细胞内 Ca²⁺ 储存在调节原代人类巨噬细胞中 TNF- α 的产生方面发挥着重要作用^[34]。上述研究提示 CCR5-IP3 信号通路可能诱导相关炎症因子调节神经系统显著相关。此外,研究证明,中脑边缘 CCR5 受体因接触可卡因而失调,影响相关的 CPP 行为效应^[35]。已有研究发现,丙泊酚可在大鼠体内产生 CPP 效应^[36]。此外,IBU 其抑制炎症细胞释放 TNF- α , 能很好地渗入中枢神经系统,阻止 TLR4 的产生^[37]。

本研究结果显示,丙泊酚依赖组大鼠 CPP 较空白组明显增高,并且 IBU 干预后 CPP 显著降低,同时丙泊酚干预组与空白组的移动距离具有显著差异,说明丙泊酚诱导大鼠形成药物依赖,使用 IBU 可抑制其对药物的依赖。丙泊酚重复使用显著上调 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平,并且显著上调组织中 TLR4 蛋白表达,诱导 p65 和 ERK1/2 磷酸化水平。在使用 IBU 预处

理组处理后,大鼠前额叶皮质组织中 CCL2、CCL5 和 TNF- α 和相应蛋白表达均出现逆转。可见丙泊酚依赖的作用是通过该信号通路增加 CCL2、CCL5 和 TNF- α 水平,诱导神经免疫反应,进而达到调节神经元功能的目的。提示 TLR4-NF κ B-P38 及 CCR5-IP3 信号通路可能通过上调胶质细胞免疫反应导致炎症介质的释放,从而导致丙泊酚药物的依赖,影响了大鼠行为学的表现。

综上所述,神经免疫调节丙泊酚药物依赖中的作用可能与 TLR4-NF κ B-P38 及 CCR5-IP3 信号通路有关。

参考文献(References)

- [1] Smith D E. The process addictions and the new ASAM definition of addiction[J]. *Journal of psychoactive drugs*, 2012, 44(1): 1-4.
- [2] Dee T S, Pyne J. A community response approach to mental health and substance abuse crises reduced crime[J]. *Science Advances*, 2022, 8(23): eabm2106.
- [3] Shahzadi A, Uskur T, Akkan AG, et al. Effects of propofol on conditioned place preference in male rats: Involvement of nitrenergic system[J]. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 2018, 44(2): 167-174.
- [4] Ring MT, Pfrimmer DM. Propofol as a Drug of Diversion: Changing Disposal Practices to Reduce Risk[J]. *Crit Care Nurse*, 2021, 41(6): 45-53.
- [5] Anton RF, Latham P, Voronin K, et al. Efficacy of Gabapentin for the Treatment of Alcohol Use Disorder in Patients With Alcohol Withdrawal Symptoms: A Randomized Clinical Trial[J]. *JAMA Intern Med*, 2020, 180(5): 728-736.
- [6] Hutchinson MR, Watkins LR. Why is neuroimmunopharmacology crucial for the future of addiction research?[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76 Pt B(0 0): 218-227.
- [7] Mahintamani T, Basu D, Ghosh A, et al. The toll of opioid dependence: A research report on the possible role of Toll-like receptor-4 and related immune markers in opioid dependence [J]. *Indian J Psychiatry*, 2023, 65(6): 626-634.
- [8] Crews FT, Walter TJ, Coleman LG Jr, et al. Toll-like receptor signaling and stages of addiction[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2017, 234(9-10): 1483-1498.
- [9] Trocello J M, Rostene W, Melik-parsadaniantz S, et al. Implication of CCR2 chemokine receptor in cocaine-induced sensitization [J]. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 2011, 44(3): 147-151.
- [10] Saika F, Matsuzaki S, Kobayashi D, et al. Chemokine CXCL1 is responsible for cocaine-induced reward in mice[J]. *Neuropsychopharmacol Rep*, 2018, 38(3): 145-148.
- [11] Lin J, Xu Y, Guo P, et al. CCL5/CCR5-mediated peripheral inflammation exacerbates blood brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage in mice[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 196.
- [12] 郭夏,王冬梅. CCL5 在病理性疼痛中的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(10): 2021-2028.
- [13] Christie M J. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction [J]. *British journal of pharmacology*, 2008, 154(2): 384-396.
- [14] Metz VE, Jones JD, Manubay J, et al. Effects of Ibudilast on the Subjective, Reinforcing, and Analgesic Effects of Oxycodone in Recently Detoxified Adults with Opioid Dependence [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(9): 1825-1832.
- [15] Cooper Z D, Johnson K W, Pavlicova M, et al. The effects of ibudilast, a glial activation inhibitor, on opioid withdrawal symptoms in opioid-dependent volunteers[J]. *Addiction biology*, 2016, 21(4): 895-903.
- [16] Viviani X, Berdugo L, De La Noe, et al. Target concentration of propofol required to insert the laryngeal mask airway in children[J]. *Paediatric anaesthesia*, 2003, 13(3): 217-222.
- [17] Huston JP, Silva Ma, Topic B, et al. What's conditioned in conditioned place preference?[J]. *Trends in pharmacological sciences*, 2013, 34(3): 162-166.
- [18] Seoane A, Massey PV, Keen H, et al. L-type voltage-dependent calcium channel antagonists impair perirhinal long-term recognition memory and plasticity processes[J]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2009, 29(30): 9534-9544.
- [19] Earley PH, Finver T. Addiction to Propofol: A Study of 22 Treatment Cases[J]. *Journal of Addiction Medicine*, 2013, 7(3): 169-176
- [20] 蒋峻宇,杨雨为,韩丽,等. 胶质细胞参与阿片类药物和中枢神经兴奋剂成瘾机制及治疗的研究进展 [J]. *中国药物依赖性杂志*, 2021, 30(3): 167-173, 192.
- [21] 刘琳,武怡,孟令建,等. 槐杞黄颗粒联合吸入糖皮质激素对支气管哮喘患儿肺功能、细胞免疫因子及 CCL3、CCL5 水平的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(24): 4781-4785.
- [22] Chun E, Lavoie S, Michaud M, et al. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function[J]. *Cell reports*, 2015, 12(2): 244-257.
- [23] Zhang Y, Miao Y, Xiong X, et al. Microglial exosomes alleviate intermittent hypoxia-induced cognitive deficits by suppressing NLRP3 inflammasome[J]. *Biology direct*, 2023, 18(1): 29.
- [24] Jiménez-González A, Gómez-Acevedo C, Ochoa-Aguilar A, et al. The Role of Glia in Addiction: Dopamine as a Modulator of Glial Responses in Addiction [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, 42(7): 2109-2120.
- [25] Su L, Zhang R, Chen Y, et al. Raf Kinase Inhibitor Protein Attenuates Ischemic-Induced Microglia Cell Apoptosis and Activation Through NF- κ B Pathway [J]. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 2017, 41(3): 1125-1134.
- [26] Fu Y J, Xu B, Huang S W, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14 [J]. *Acta pharmacologica Sinica*, 2021, 42(1): 88-96.
- [27] Zeng Z, Lan T, Wei Y, et al. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments[J]. *Genes & diseases*, 2022, 9(1): 12-27.
- [28] Wang Q, Kong Y, Wu DY, et al. Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3321.
- [29] Horioka M, Ceraudo E, Lorenzen E, et al. Purinergic Receptors Crosstalk with CCR5 to Amplify Ca²⁺ Signaling [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, 41(5): 1085-1101.
- [30] Yeo A, Samways DS, Fowler CE, et al. Coincident signalling

- between the Gi/Go-coupled delta-opioid receptor and the Gq-coupled m3 muscarinic receptor at the level of intracellular free calcium in SH-SY5Y cells[J]. *Journal of neurochemistry*, 2001, 76(6): 1688-700.
- [31] Corriden R, Insel PA. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation[J]. *Science signaling*, 2010, 3(104): re1
- [32] Zhang YV, Ormerod KG, Littleton JT. Astrocyte Ca²⁺ Influx Negatively Regulates Neuronal Activity[J]. *eNeuro*, 2017, 4(2): 0340-0416.
- [33] Gomez LC, Kawaguchi SY, Collin T, et al. Influence of spatially segregated IP3-producing pathways on spike generation and transmitter release in Purkinje cell axons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(20): 11097-11108.
- [34] Malko P, Jia X, Wood I, et al. Piezo1 channel-mediated Ca²⁺ signaling inhibits lipopolysaccharide-induced activation of the NF- κ B inflammatory signaling pathway and generation of TNF- α and IL-6 in microglial cells[J]. *Glia*, 2023, 71(4): 848-865.
- [35] Nayak SU, Cicalese S, Tallarida C, et al. Chemokine CCR5 and cocaine interactions in the brain: Cocaine enhances mesolimbic CCR5 mRNA levels and produces place preference and locomotor activation that are reduced by a CCR5 antagonist [J]. *Brain behavior and immunity*, 2020, 34(1): 288-292.
- [36] Shahzadi A, Uskur T, Akkan AG, et al. Effects of propofol on conditioned place preference in male rats: Involvement of nitergic system[J]. *The American journal of drug and alcohol abuse*, 2018, 44(2): 167-174.
- [37] Wu NC, Wang JJ. Ibutilast, a Phosphodiesterase Inhibitor and Toll-Like Receptor-4 Antagonist, Improves Hemorrhagic Shock and Reperfusion-Induced Left Ventricular Dysfunction by Reducing Myocardial Tumor Necrosis Factor α [J]. *Transplant Proc*, 2020, 52(6): 1869-1874.

(上接第 3216 页)

- [14] Tuli H S, Rath P, Chauhan A, et al. Wogonin, as a potent anticancer compound: From chemistry to cellular interactions [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(9): 820-828.
- [15] 单慧, 杜胤骁, 白鹤群, 等. 黄芩素的研发进展及其临床药理学[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(6): 701-708.
- [16] Shi X, Zhang B, Chu Z, et al. Wogonin Inhibits Cardiac Hypertrophy by Activating Nrf-2-Mediated Antioxidant Responses [J]. *Cardiovasc Ther*, 2021, 1(2)1: 9995342-995354.
- [17] Xu J, Zhang B, Chu Z, et al. Wogonin Alleviates Cisplatin-induced Cardiotoxicity in Mice Via Inhibiting Gasdermin D-mediated Pyroptosis[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(4): 597-603.
- [18] Wei Y, Zhao J, Xiong J, et al. Wogonin reduces cardiomyocyte apoptosis from mitochondrial release of cytochrome c to improve doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(3): 205-213.
- [19] Bei W, Jing L, Chen N. Cardio protective role of wogonin loaded nanoparticle against isoproterenol induced myocardial infarction by moderating oxidative stress and inflammation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 185(1): 110635.
- [20] Zhou Z, Liu Z, Zhang C, et al. Mild hypothermia alleviates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppressing pyroptosis through AMPK/NLRP3 inflammasome pathway in rats[J]. *Brain Res Bull*, 2023, 193(1): 72-83.
- [21] 苏婷, 宋晓伟, 史承勇, 等. PRKAG2-AS1 通过 AMPK 抑制缺氧所致心肌细胞凋亡[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(4): 608-613, 677.
- [22] Zhang H, Gong X, Ni S, et al. C1q/TNF-related protein-9 attenuates atherosclerosis through AMPK-NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77(1): 105934.
- [23] Yao M, Wang Z, Jiang L, et al. Oxytocin ameliorates high glucose and ischemia/reperfusion-induced myocardial injury by suppressing pyroptosis via AMPK signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153(1): 113498-1134507.
- [24] Wang Y, Sheng Y, Ji N, et al. Gentiopicroside enhances the protective effect of trimetazidine against myocardial ischemia-reperfusion injury via the AMPK/NLRP3 inflammasome signaling[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37(7): 23366.
- [25] 张晓蕾, 张凯, 秦永亭, 等. 木犀草素调控 AMPK/NLRP3 轴介导的细胞焦亡对病毒性心肌炎的保护作用 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(5): 514-519.