张涛,曾凌竹. 右美托咪定通过调控 TLR4 表达对神经细胞氧糖剥夺损伤保护作用的机制研究［J］. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 69-75.
Zhang T, Zeng LZ. Protective effect of dexmedetomidine on oxygen-glucose deprivation injury of neurons by regulating TLR4 expression［J］. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 69-75.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.012

右美托咪定通过调控 TLR4 表达对神经细胞氧糖剥夺损伤保护作用的机制研究

张　涛,曾凌竹*

(重庆三峡中心医院,重庆　404000)

【摘要】　目的　探讨右美托咪定调控 TLR4 表达对神经细胞氧糖剥夺损伤的保护作用及其机制。**方法**　体外培养 PC12 神经细胞,复制氧糖剥夺细胞模型,以低(0.1 μmol/L)、中(1.0 μmol/L)和高剂量(10.0 μmol/L)右美托咪定作用 24 h 后,CCK-8 法检测细胞存活率,Western blot 检测 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和 Toll 样受体 4(TLR4)蛋白的表达,RT-PCR 法检测 TLR4 mRNA 的表达,ELISA 法检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)含量。在复制氧糖剥夺细胞模型中,以 TLR4 抑制剂 TAK-242 抑制 TLR4 表达后,给予右美托咪定作用,观察细胞存活率、Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白、TLR4 蛋白、TNF-α 含量和 IL-6 含量的变化。**结果**　低、中和高剂量右美托咪定作用后,PC12 细胞存活率升高,Bax 和 TLR4 蛋白表达、TLR4 mRNA 表达以及 TNF-α 和 IL-6 含量降低,而 Bcl-2 蛋白表达升高($P<0.05$),且表现出浓度依赖性。TAK-242 处理后,TLR4 表达降低,PC12 细胞存活率升高,Bax 蛋白表达以及 TNF-α 和 IL-6 含量降低,而 Bcl-2 蛋白表达升高($P<0.05$);给予右美托咪定作用后,TAK-242 的上述作用明显增强($P<0.05$)。**结论**　右美托咪定可通过抑制 TLR4 表达保护神经细胞氧糖剥夺损伤。

【关键词】　神经细胞;氧糖剥夺损伤;右美托咪定;Toll 样受体 4;保护机制
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2019) 01-0069-07

Protective effect of dexmedetomidine on oxygen-glucose deprivation injury of neurons by regulating TLR4 expression

ZHANG Tao, ZENG Lingzhu*
(Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

【Abstract】　Objective　To investigate the protective effect of dexmedetomidine to regulate TLR4 expression on oxygen glucose deprivation injury in neurons and its mechanism. **Methods**　PC12 cells were cultured *in vitro*, and the oxygen glucose deprivation cell model was generated. The cell survival rate was detected by CCK-8 test, the expressions of Bax, Bcl-2 and TLR4 proteins were detected by Western blot, the expression of TLR4 mRNA was detected by RT-PCR, and the levels of TNF-α and IL-6 were detected by ELISA after treatment with low (0.1 μmol/L), medium (1.0 μmol/L) and high doses (10.0 μmol/L) of dexmedetomidine for 24 h. In the replicating oxygen-deprived cell model, the expression of TLR4 was inhibited by the TLR4 inhibitor TAK-242. Dexmedetomidine altered the cell survival rate, and levels of Bax,

[作者简介]张涛(1979—),男,主治医师。E-mail: 3024310044@qq.com
[通信作者]曾凌竹(1981—),男,主治医师。E-mail: 23975909@qq.com

Bcl-2, TLR4, TNF-α and IL-6 proteins. **Results** The survival rate of PC12 cells was increased, the expressions of Bax, TLR4, TNF-α, and IL-6 proteins, and TLR4 mRNA were decreased, and the expression of Bcl-2 protein was increased ($P<0.05$). This was concentration-dependent after treatment with low, moderate, and high dose dexmedetomidine. After TAK-242 treatment, the expression of TLR4 was decreased, the survival rate of PC12 cells was increased, the expressions of Bax, TNF-α, and IL-6 proteins were decreased, while the expression of Bcl-2 protein was increased ($P<0.05$). The effect of TAK-242 was enhanced after treatment with dexmedetomidine ($P<0.05$). **Conclusions** Dexmedetomidine protected neurons from oxygen glucose deprivation by inhibiting the expression of TLR4.

【**Keywords**】 neurons; oxygen glucose deprivation injury; dexmedetomidine; Toll-like receptor 4 (TLR4); protective mechanism

脑卒中是一种中老年人常见的神经系统疾病，随着我国老龄化的加剧，预后和治疗高发病率、高致残率和高死亡率的脑卒中已刻不容缓。缺血性脑卒中是脑卒中的主要病理类型，其与神经细胞凋亡、兴奋性中毒、氧化应激和炎症反应等多种发病机制有关[1-2]。Toll 样受体 4(TLR4)是 Toll 样受体家族中研究较多的成员，可通过多种途径参与细胞凋亡、免疫和炎症反应，在机体抵抗病原体感染或组织损伤方面发挥着积极作用，与神经细胞疾病、免疫性疾病、癌症等多种疾病的发生发展密切相关[3-5]。右美托咪定是一种有效的 α2-肾上腺素受体激动剂，也是临床上辅助患者镇静和全身麻醉的常用药物。前人研究[6-7]已证实右美托咪定对神经功能损伤具有较好的保护作用，但其有无介导 TLR4 表达参与神经细胞损伤的保护机制尚不清楚。因此，本研究通过构建氧糖剥夺损伤细胞模型，从炎症反应上分析右美托咪定调控 TLR4 表达对神经细胞氧糖剥夺损伤的保护机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PC12 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所。采用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)于 37℃和 5%CO_2 培养箱内常规培养。以 0.25%胰蛋白酶消化传代，收集第 3 代长势良好的对数生长期细胞进行实验。

1.2 主要试剂与仪器

右美托咪定购于江苏恒瑞医药公司，DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购于美国 Gibco 公司，Trizol 试剂、TLR4 抑制剂 TAK-242 购于美国 Takeda 公司 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ购于北京聚合美生物公司，Bax 抗体和 Bcl-2 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司，TLR4 抗体和 β 肌动蛋白(β-actin)抗体购于美国 Proteintech 公司。辣根酶标记的二抗购于北京中杉金桥公司。细胞裂解液、CCK-8 试剂盒、ECL 化学发光试剂盒和逆转录试剂盒购于碧云天生物技术研究所，BCA 法蛋白含量检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展公司，肿瘤坏死因子-α(TNF-α) ELISA 试剂盒和和白细胞介素-6(IL-6) ELISA 试剂盒购于美国 R&D 公司。CO_2 细胞培养箱购于美国 Forma 公司，酶标仪和凝胶成像系统购于美国 Bio-Rad 公司，有机玻璃密闭缺氧箱为自制。PCR 仪购于上海赛默生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

将对数生长期的 PC12 细胞随机分为对照组：正常培养，模型组：制备氧糖剥夺模型，右美托咪定低、中和高剂量组：在氧糖剥夺模型基础上给予终浓度为 0.1、1.0 和 10.0 μmol/L 右美托咪定。后期实验分为模型组：制备氧糖剥夺模型，抑制剂组：在氧糖剥夺模基础上给予终浓度为 30 μmol/L TLR4 抑制剂 TAK-242，抑制剂+右美托咪定组：在氧糖剥夺模基础上给予终浓度为 30 μmol/L TLR4 抑制剂 TAK-242 和终浓度为 10 μmol/L 右美托咪定。

1.3.2 氧糖剥夺细胞模型的建立

采用无血清、无糖的 pH 7.2 的洛克缓冲液(5.6 mmol/L KCl+154 mmol/L NaCl+1 mmol/L $MgCl_2$+2.3 mmol/L CaCl2+3.6 mmol/L $NaHCO_3$+6 mmol/L HEPES+5 mg/mL 庆大霉素)培养 PC12 细胞，先置于含 5% CO_2 和 95%N_2 的缺氧培养箱中培养 1 h，再置于含 5% CO_2 和 95%空气的培养箱中培养 24 h。右美托咪定处理组在氧糖剥夺及复糖氧过程中均采用含相应浓度的右美托咪定培养基。

1.3.3 细胞存活率的测定

取对数生长期的 PC12 细胞，在 96 孔板上接种细胞浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液 200 μL/孔，于培养箱中培养至细胞贴壁 75%时，参照 1.3 中的分组及 1.4 中的处理进行操作，每组设置 5 个复孔。培养结

束后,弃培养基,加入 CCK-8 试剂 10 μL 孵育 1 h。以酶标仪检测 450 nm 波长处各组细胞的吸光度(OD)值,以无细胞的培养液调零,并根据公式:细胞存活率=100%×(实验组 OD 值-空白孔 OD 值)/(对照组 OD 值-空白孔 OD 值)计算各组细胞的存活率。每组细胞测定 3 次。

1.3.4　Western blot 检测

收集各组 PC12 细胞,加入细胞裂解液提取总蛋白后,采用 BCA 法对总蛋白样品进行浓度的定量。以每孔 50 μg 蛋白样品进行凝胶电泳分离,浓缩胶电压设为 80 V,分离胶单压设为 120 V。电泳结束后,将蛋白凝胶转至 NC 膜,置于封闭液中常温封闭 2 h。加入稀释比例为 1∶1000 的特异性一抗(Bax、Bcl-2、TLR4 和 β-actin)摇床 4℃下孵育 24 h。封闭液洗膜 3 次后,加入稀释比例为 1∶2000 的二抗摇床 37℃孵育 1 h。参照 ECL 化学发光试剂盒暗室中显色、曝光,以 β-actin 为内参,采用凝胶成像分析系统分析目的蛋白的相对表达水平。每组细胞测定 3 次。

1.3.5　RT-PCR 检测

采用 Trizol 法提取 PC12 细胞的总 RNA,定量 RNA 纯度后,以其作为模板,逆转录合成 cDNA。再取 2.5 μL cDNA 作模板,加入各 1 μL 上下游引物、12.5 μL SYBR Premix Ex Taq Ⅱ(2×)和 8 μL 无核酸酶水配制 25 μL 的 PCR 反应体系,设定 PCR 仪的三个阶段的反应条件分别为 1)94℃ 5 min,2)94℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 1 min,3)72℃ 5 min。其中第二阶段循环 35 次。TLR4 引物上游序列为 5'-GATTGCTCAGACATGGCA -GT-3',下游序列为 5'-CCCACTCGAGGTAGGTGTTT-3',内参 β-actin 引物上游序列 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',下游序列为 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3',均由上海生工生物公司合成。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法检测各组细胞中 TLR4 mRNA 的相对表达水平。每组细胞测定 3 次。

1.3.6　ELISA 检测

每组取 100 μL 细胞上清液,参照 TNF-α、IL-6 ELISA 检测试剂盒说明书步骤检测各组细胞的 TNF-α 和 IL-6 含量。每组细胞测定 3 次。

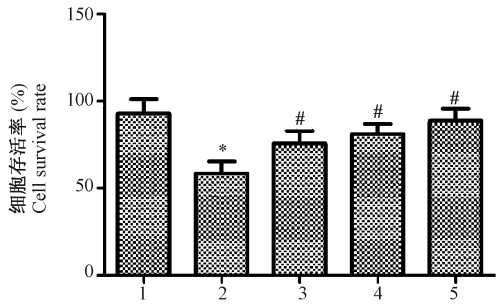
1.4　统计学方法

实验中所有数据均采用 SPSS 21.0 软件进行处理,结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较经 SNK-q 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有显著性。

2　结果

2.1　右美托咪定对 PC12 细胞增殖的影响

对照组、模型组以及右美托咪定低、中和高剂量组细胞中细胞存活率分别为(92.88±11.25)%、(58.62±6.76)%、(75.85±7.05)%、(81.24±5.65)%和(88.76±6.93)%,五组整体比较差异有显著性($F=8.907$, $P=0.003$ 与对照组细胞存活率相比,经氧糖剥夺处理后的模型组细胞的存活率明显降低($P<0.05$)。给予低、中和高剂量的右美托咪定处理后,PC12 细胞的存活率分别与模型组相比,均明显升高($P<0.05$),且呈浓度依赖性($t_1=2.716$, $t_2=3.565$, $t_3=4.751$, $P<0.05$)。结果见图 1。



注:1:对照组;2:模型组;3:右美托咪定低剂量组;4:右美托咪定中剂量组;5:右美托咪定高剂量组。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$。

图 1　右美托咪定对 PC12 细胞增殖的影响

Note. 1: Control group; 2: Model group; 3: Dexmedetomidine low dose group; 4: Dexmedetomidine medium dose group; 5: Dexmedetomidine high dose group. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 1　Effect of dexmedetomidine on the proliferation of PC12 cells

2.2　右美托咪定对 PC12 细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

Western blot 检测对照组、模型组以及右美托咪定低、中和高剂量组细胞中 Bax 蛋白的相对表达量分别为 0.18±0.02、1.22±0.08、0.85±0.05、0.37±0.03 和 0.22±0.02,Bcl-2 蛋白的相比表达量分别为 0.83±0.06、0.23±0.02、0.35±0.03、0.46±0.02 和 0.55±0.03。对照组、模型组以及右美托咪定低、中和高剂量组细胞中 Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白的相比表达量分别整体比较差异有显著性($F_{Bax}=288.495$, $P_{Bax}<0.05$; $F_{Bcl-2}=125.274$, $P_{Bcl-2}<0.05$)。与对照组相比,模型组细胞中 Bax 蛋白表达明显升高($P<0.05$),而 Bcl-2 蛋

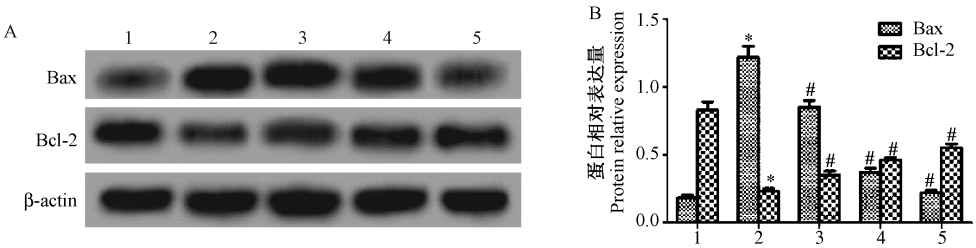
白表达明显降低($P<0.05$);与模型组相比,右美托咪定低、中和高剂量组中 Bax 蛋白表达显著降低($P<0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达显著升高($P<0.05$),且呈现浓度依赖性改变。结果见图 2。

2.3 右美托咪定对 PC12 细胞炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的影响

氧糖剥夺后 PC12 细胞、对照组、右美托咪定低、中和高浓度处理组中 TNF-α 含量分别为(865.38±52.16) pg/mL、(328.76±37.45) pg/mL、(668.95±27.56) pg/mL、(611.52±25.48) pg/mL 和(573.46±22.37) pg/mL,IL-6 含量分别为(235.42±23.16) pg/mL、(128.65±11.58) pg/mL、(188.73±18.25) pg/mL、(171.55±20.47) pg/mL 和(154.32±12.64) pg/mL,分别整体比较差异有显著性($F_{TNF-\alpha}=92.704$, $P_{TNF-\alpha}<0.05$; $F_{IL-6}=15.225$, $P_{IL-6}<0.05$)氧糖剥夺后 PC12 细胞上清液中 TNF-α 含量 IL-6 含量明显高于对照组中 TNF-α 含量 IL-6 含量($P<0.05$),右美托咪定各浓度处理组均能够降低氧糖剥后 TNF-α 和 IL-6 含量($P<0.05$)。结果见图 3。

2.4 右美托咪定对 PC12 细胞中 TLR4 mRNA 和蛋白的表达

RT-PCR 检测对照组、模型组、右美托咪定低剂量组、右美托咪定中剂量组和右美托咪定高剂量组细胞中 TLR4 mRNA 的相对表达量分别为 1.23±0.09、5.45±0.48、4.15±0.39、2.95±0.30 和 1.78±0.18,整体比较差异有显著性($F=86.887$, $P<0.05$)结果见图 4A;Western blot 检测各组细胞中 TLR4 蛋白的相对表达量分别为 0.15±0.02、1.18±0.25、0.75±0.06、0.42±0.03 和 0.28±0.02,整体比较差异有显著性($F=37.971$, $P<0.05$)结果见图 4B 和 4C。与对照组相比,模型组细胞中TLR4 mRNA和蛋白的表达水平均显著

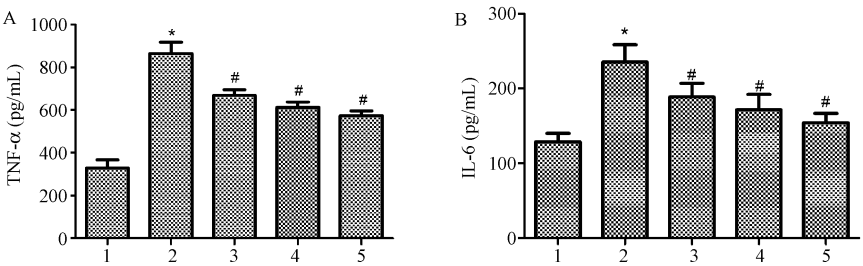


注:A:Western blot 检测结果,B:Bax 和 Bcl-2 蛋白的相对表达量。1:对照组;2:模型组;3:右美托咪定低剂量组;4:右美托咪定中剂量组;5:右美托咪定高剂量组。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$。

图 2 各组细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

Note. A: Result of Western blot. B: Relative expressions of Bax and Bcl-2 proteins. 1: Control group; 2: Model group; 3: Dexmedetomidine low dose group; 4: Dexmedetomidine medium dose group; 5: Dexmedetomidine high dose group. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 2 Expression of Bax and Bcl-2 proteins in cells from each group



注:A:TNF-α 含量;B:IL-6 含量。1:对照组;2:模型组;3:右美托咪定低剂量组;4:右美托咪定中剂量组;5:右美托咪定高剂量组。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$。

图 3 右美托咪定对 TNF-α 和 IL-6 的影响

Note: A: TNF-α content. B: IL-6 content. 1: Control group; 2: Model group; 3: Dexmedetomidine low dose group; 4: Dexmedetomidine medium dose group; 5: Dexmedetomidine high dose group. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 3 Effect of dexmedetomidine on TNF-α and IL-6 levels

升高($P<0.05$),而右美托咪定低剂量组、右美托咪定中剂量组和右美托咪定高剂量组中 TLR4 mRNA 和蛋白的表达水平较模型组均呈浓度依赖性降低,且差异有显著性($P<0.05$)。

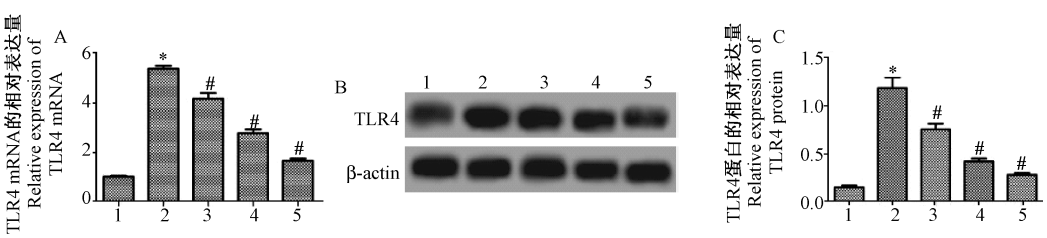
2.5　右美托咪定调控 TLR4 表达对 PC12 细胞的影响

模型组、抑制剂组和抑制剂+右美托咪定组细胞的存活率分别为(63.76±5.53)%、(76.22±4.15)%和(89.65±5.36)%,Bax 蛋白的相对表达量分别为 1.18±0.09、0.48±0.03 和 0.24±0.02,Bcl-2 蛋白表达量分别为 0.26±0.03、0.55±0.04 和 0.89±0.06,TLR4 蛋白的表达量分别为 0.92±0.06、0.42±0.05 和 0.13±0.02,TNF-α 含量分别为(887.26±39.25)pg/mL、(695.48±22.16)pg/mL 和(426.18±25.42)pg/mL,IL-6 含量分别为(245.68±22.25)pg/mL、(188.46±21.15)pg/mL 和(117.85±18.65)pg/mL。模型组、抑制剂组和抑制剂+右美托咪定组分别整体比较差异均有显著性($F_{存活率}=19.715$, $P_{存活率}<0.05$; $F_{Bax}=228.383$, $P_{Bax}<0.05$; $F_{Bcl\text{-}2}=146.705$, $P_{Bcl\text{-}2}<0.05$; $F_{TLR4}=221.123$, $P_{TLR4}<0.05$; $F_{TNF\text{-}\alpha}=180.063$, $P_{TNF\text{-}\alpha}<0.05$; $F_{IL\text{-}6}=28.601$, $P_{IL\text{-}6}<0.05$)。给予 30 μmol/L TLR4 抑制剂处理后,PC12 细胞的存活率和 Bcl-2 蛋白表达升高,Bax 和 TLR4 蛋白表达以及 TNF-α 和 IL-6 含量降低;给予 10 μmol/L 右美托咪定处理后,TLR4 抑制剂对 PC12 细胞的存活率、Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白、TLR4 蛋白表达以及 TNF-α、IL-6 含量的调控作用明显增强,结果见图 5。

3　讨论

我国脑卒中的发病率有明显升高和年轻化的趋势,而目前对于脑卒中导致的患者瘫痪、感觉和认知功能障碍以及死亡仍然缺乏有效的治疗手段,探讨脑卒中的发病机制,寻找有效的治疗药物及靶点是脑卒中疾病研究的热点[8-10]。右美托咪定是一种麻醉辅助药,具有镇静、镇痛和抑制交感神经的作用,其可通过调控细胞凋亡、细胞炎症和氧化应激反应等多种途径改善组织缺血再灌注损伤。例如:右美托咪定可通过抑制 caspase-3 活性抑制细胞凋亡,改善肾缺血再灌注损伤[11];还可通过调控 NLRC5 缺陷小鼠细胞中炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 和氧化应激因子 iNOS 表达反应参与肝缺血/再灌注损伤的保护作用[12]。TLR4 是一种重要的模式识别受体,可通过调控下游 NF-κB 信号通路和 TNF-α、IL-6、IL-8 等炎症因子在炎症反应中发挥着重要的调控作用[13-14];作为一种广泛存在于脑组织不同细胞的受体分子,TLR4 已被证实可通过调控 NF-κB 信号通路引起脑神经细胞的炎症损伤和凋亡[15-16]。有报道[17-18]指出,右美托咪定可作为神经保护剂,抑制海马区神经细胞凋亡和上调 HSP70 表达改善脑损伤;同时,右美托咪定可通过调控 TLR4 表达改善心肌缺血/再灌注损伤,但右美托咪定有无介导 TLR4 表达参与保护神经细胞损伤的分子机制并不清楚。

为了探讨相关机制,本研究通过构建氧糖剥夺细胞模型,以低、中和高剂量右美托咪定作用 PC12 神经细胞,采用 CCK-8 法检测细胞存活率,Western blot 检测促凋亡蛋白 Bax 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达,ELISA 法检测炎症因子 TNF-α 和 IL-6 含量。结果发现,右美托咪定能够呈浓度依赖性提高 PC12 细胞存活率,并下调 Bax 和上调 Bcl-2 表达,降低 TNF-α 和 IL-6 含量。结果表明,右美托咪定可通过促进神经细胞增殖、抑制神经细胞凋亡及减轻炎症反应

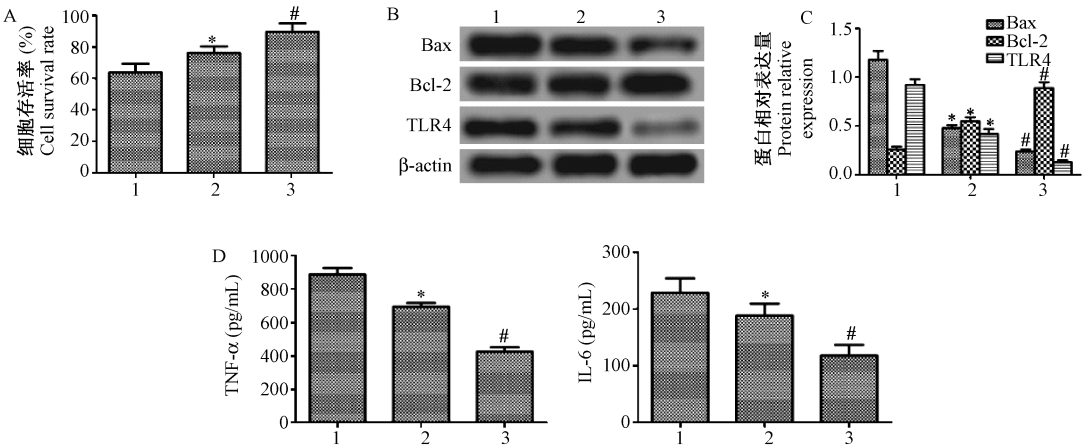


注:A:RT-PCR 检测结果;B:Western blot 检测结果;C:TLR4 蛋白的相对表达量。1:对照组;2:模型组;3:右美托咪定低剂量组;4:右美托咪定中剂量组;5:右美托咪定高剂量组。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$。

图 4　各组细胞中 TLR4 mRNA 和蛋白的表达

Note. A: Results of RT-PCR detection. B: Western blot test results. C: Relative expression of TLR4 protein. 1: Control group; 2: Model group; 3: Dexmedetomidine low dose group; 4: Dexmedetomidine medium dose group; 5: Dexmedetomidine high dose group. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 4　Expression of TLR4 mRNA and protein in cells from each group



注:A:细胞存活率;B:Western blot 检测结果;C:蛋白的相对表达量;D:TNF-α 和 IL-6 含量。1:模型组;2:抑制剂组;3:抑制剂+右美托咪定组。与模型组相比,* $P<0.05$;与模型+抑制剂组相比,# $P<0.05$。

图 5 右美托咪定调控 TLR4 表达对 PC12 细胞的影响

Note. A: Cell survival rate. B: Result of Western blot. C: Relative expression of protein. D: TNF-α and IL-6 levels. 1: Model group; 2: Inhibitor group; 3: Inhibitor + dexmedetomidine group. Compared with the model group, * $P<0.05$. Compared with the model + inhibitor group, # $P<0.05$.

Figure 5 The effect of dexmedetomidine on the expression of TLR4 in PC12 cells

发挥改善神经细胞损伤的作用,这一结果与龚辉等[19]发现的右美托咪定改善大鼠脑缺血再灌注损伤的机制相吻合。我们通过 RT-PCR 和 Western blot 进一步检测发现,PC12 细胞中 TLR4 mRNA 和蛋白的表达均随右美托咪定浓度的升高而降低。结果提示,右美托咪定可能通过抑制 TLR4 表达参与神经细胞损伤的保护作用。已有研究[20-21]证实,TLR4 可调控神经细胞凋亡,在 TLR4 基因敲除的小鼠脑组织神经元细胞神经元凋亡指数和 Bax/Bcl-2 比值升高;另外,TLR4 的激活可促进炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的表达。为了验证右美托咪定通过抑制 TLR4 表达参与神经细胞损伤的保护机制这一结果,我们采用 30 μmol/L TLR4 抑制剂 TAK-242 抑制 TLR4 表达后,观察发现 PC12 细胞的存活率、凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达以及炎症因子 TNF-α 和 IL-6 含量的变化趋势与右美托咪定作用的结果相一致;同时在抑制 TLR4 表达基础上,给予 10 μmol/L 右美托咪定作用后,TLR4 抑制剂的作用明显增强。结果证实,右美托咪定通过抑制 TLR4 表达参与神经细胞的增殖、凋亡、炎症反应等过程,进而发挥保护作用。

总之,我们从细胞水平上证实了右美托咪定可改善神经细胞氧糖剥夺损伤,其可通过抑制 TLR4 表达参与及其神经细胞的保护作用。该结果为右美托咪定有效治疗缺血性脑损伤提供了新的依据,也为 TLR4 有望成为缺血性脑损伤的治疗靶点提供了参考依据。

参考文献:

[1] Mei ZG, Tan LJ, Wang J F, et al. Fermented Chinese formula Shuan-Tong-Ling attenuates ischemic stroke by inhibiting inflammation and apoptosis [J]. Neural Regen Res, 2017, 12(3): 425-432.

[2] 吴咏梅, 陶茹莹, 孟祥宝,等. 缺血性脑卒中损伤机制研究进展 [J]. 吉林中医药, 2018(3): 368-372.

[3] Qin Y, Liu Y, Hao W, et al. Stimulation of TLR4 attenuates Alzheimer's disease-related symptoms and pathology in tau-transgenic mice [J]. J Immunol, 2016, 197(8): 3281-3292.

[4] Mukherjee S, Karmakar S, Babu SPS. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review [J]. Braz J Infect Dis 2016, 20(2): 193-204.

[5] Bowtell D, Chenevix-Trench G, Green A, et al. MyD88 and TLR4 expression in epithelial ovarian cancer [J]. Mayo Clin Proc, 2018, 93(3): 307-320.

[6] 陈丽娇, 薛庆生, 于布为. 右美托咪定的神经保护作用及其相关机制 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1493-1496.

[7] Wang Z, Kou D, Li Z, et al. Effects of propofol-dexmedetomidine combination on ischemia reperfusion-induced cerebral injury [J]. NeuroRehabilitation, 2014, 35(4): 825-834.

[8] 张真, 许春利, 方瑜. 中青年脑卒中生化危险因素的研究进展[J]. 中国医师杂志, 2016, 18(8):1275-1278.

[9] 姚弘毅, 柳湘洁, 程凯, 等. 中风患者并发应激性溃疡的联合治疗探索[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(11): 1016

-1020.

[10] Piao JM, Wu W, Yang ZX, et al. MicroRNA-381 favors repair of nerve injury through regulation of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway via LRRC4 in acute cerebral ischemia after cerebral lymphatic blockage[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(3): 890-906.

[11] Bagcik E, Ozkardesler S, Boztas N, et al. Efectos de la dexmedetomidina en conjunto conel precondicionamiento isquémico remoto en la lesión de isquemia-reperfusión renal en ratones[J]. Braz J Anesthesiol, 2014, 64(6):382-390.

[12] Chen Z, Ding T, Ma CG. Dexmedetomidine (DEX) protects against hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury by suppressing inflammation and oxidative stress in NLRC5 deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(2):1143-1150.

[13] Li J, Fan X, He W, et al. CD200Fc reduces TLR4-mediated inflammatory responses in LPS-induced rat primary microglial cells via inhibition of the NF-κB pathway[J]. Inflamm Res, 2016, 65(7):521-532.

[14] Huang J, Yang Q, He L, et al. Role of TLR4 and miR-155 in peripheral blood mononuclear cell-mediated inflammatory reaction in coronary slow flow and coronary arteriosclerosis patients[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(2): e22232.

[15] 杨雪华, 王锐, 陈立杰. Toll 样受体 4 信号通路对脑缺血损伤影响的研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2016, 24(4):23-27.

[16] Zhao H, Chen Z, Xie LJ, et al. Suppression of TLR4/NF-κB signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(5): 4311-4319.

[17] Zhang MH, Zhou XM, Cui JZ, et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine on traumatic brain injury: Involvement of neuronal apoptosis and HSP70 expression[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6):8079-8086.

[18] Zhang JJ, Peng K, Zhang J, et al. Dexmedetomidine preconditioning may attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury by down-regulating the HMGB1-TLR4-MyD88-NF-κB signaling pathway[J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0172006.

[19] 龚辉, 张巧梅, 王强. 右美托咪定对大鼠脑缺血再灌注损伤后长期的神经保护作用[J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(2):138-142.

[20] 陈婷, 邹玉凤, 陈畅, 等. Toll 样受体 4 在机械通气致小鼠脑组织神经元凋亡中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(7):847-850.

[21] Putra AB, Nishi K, Shiraishi R, et al. Jellyfish collagen stimulates production of TNF-α and IL-6 by J774.1 cells through activation of NF-κB and JNK via TLR4 signaling pathway[J]. Mol Immunol, 2014, 58(1):32-37.

〔收稿日期〕2018-07-13

专题计划

2019 年《中国比较医学杂志》专题计划

《中国比较医学杂志》2019 年第 3 期　专题:基因工程猪研究及其应用
主持人:顾为望
E-mail: Guww100@163.com

《中国比较医学杂志》2019 年第 8 期　专题:实验动物新资源开发研究
主持人:刘云波
E-mail: yunboliu@126.com

《中国比较医学杂志》2019 年第 10 期　专题:代谢性肥胖动物模型应用研究
主持人:周迎生
E-mail: zys626@aliyun.com

《中国比较医学杂志》2019 年第 11 期　专题:肿瘤模型的制备及评价应用研究
主持人:师长宏
E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

《中国比较医学杂志》2019 年第 12 期　专题:药物安全性评价专题
主持人:靳洪涛
E-mail: jinhongtao@ugcro.com

有相关研究内容请与主持人联系!