

本文引用: 陈基胜, 符明君, 林玉美. 普鲁卡因对缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞损伤的影响及分子机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(6): 473-480. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.06.003.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-06-0473-08

· 实验研究 ·

普鲁卡因对缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞损伤的影响及分子机制

陈基胜, 符明君, 林玉美

(海口市第三人民医院麻醉科, 海南省海口市 571138)

[摘要] **[目的]** 探讨普鲁卡因对缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞损伤的影响及分子机制。**[方法]** N9 细胞、PC12 细胞分为对照组、缺氧组、低、中、高剂量普鲁卡因组(缺氧+2、6、18 mg/L 普鲁卡因)、anti-miR-con 组、anti-miR-369-3p 组、miR-con+高剂量普鲁卡因组(转染 miR-con+缺氧+18 mg/L 普鲁卡因)、miR-369-3p+高剂量普鲁卡因组(转染 miR-369-3p+缺氧+18 mg/L 普鲁卡因)。流式细胞术检测细胞凋亡, 试剂盒检测细胞中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性, ELISA 检测炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)和白细胞介素 6(IL-6)水平, RT-qPCR 检测 miR-369-3p 表达水平。**[结果]** 相比于对照组, 缺氧组 N9 细胞、PC12 细胞凋亡率升高, MDA、ROS 含量升高, SOD 活性降低, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高, miR-369-3p 表达水平升高($P<0.05$)。相比于缺氧组, 低、中、高剂量普鲁卡因组 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡率降低, MDA、ROS 含量降低, SOD 活性升高, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低, miR-369-3p 表达水平降低, 且均具有浓度依赖性($P<0.05$); 相比于 anti-miR-con 组, anti-miR-369-3p 组 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡率降低, ROS 和 MDA 含量降低, SOD 活性升高, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低($P<0.05$)。相比于 miR-con+高剂量普鲁卡因组, miR-369-3p+高剂量普鲁卡因组 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡率升高, cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高, MDA、ROS 含量升高, SOD 活性降低, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高($P<0.05$)。**[结论]** 普鲁卡因可减轻缺氧诱导的 N9 细胞和 PC12 细胞损伤, 其机制可能与抑制 miR-369-3p 表达有关。

[关键词] 普鲁卡因; miR-369-3p; N9 细胞; PC12 细胞; 细胞凋亡; 缺血性脑卒中

[中图分类号] R743.31;R5

[文献标识码] A

Effects of procaine on hypoxia induced injury of N9 and PC12 cells and its molecular mechanism

CHEN Jisheng, FU Mingjun, LIN Yumei

(Department of Anesthesiology, Haikou Third People's Hospital, Haikou, Hainan 571138, China)

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and molecular mechanism of procaine on hypoxia induced injury of N9 and PC12 cells. **Methods** N9 cells and PC12 cells were divided into control group, hypoxia group, low, medium and high dose (hypoxia+2, 6, 18 mg/L procaine) procaine group, anti-miR-con group, anti-miR-369-3p group, miR-con+high dose procaine group (transfection miR-con+hypoxia+18 mg/L procaine), miR-369-3p+high dose procaine group (transfection miR-369-3p+hypoxia+18 mg/L procaine). Flow cytometry was used to detect apoptosis, reagent kit was used to detect the content of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD), ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6). RT-qPCR was used to detect the expression of miR-369-3p. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate of N9 cells and PC12 cells in the hypoxia group increased, the content of MDA and ROS increased, the activity of SOD decreased, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 increased, the expression of miR-369-3p increased ($P<0.05$). Compared with the hypoxia group, the apoptosis rate of N9 cells and

[收稿日期] 2022-08-18

[修回日期] 2022-12-06

[基金项目] 海南省医药卫生科研项目(1501032021A2001)

[作者简介] 陈基胜, 主治医师, 研究方向为麻醉学, E-mail: cxmgha@163.com。通信作者符明君, 副主任医师, 研究方向为麻醉相关基础研究, E-mail: 1083645733@qq.com。

PC12 cells in the low, medium and high dose procaine groups decreased, the content of MDA and ROS decreased, the activity of SOD increased, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased, the expression of miR-369-3p decreased in a concentration dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the anti-miR-con group, the apoptosis rate of N9 cells and PC12 cells in the anti-miR-369-3p group decreased, the content of ROS and MDA decreased, the activity of SOD increased, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased ($P < 0.05$). Compared with miR-con+high dose procaine group, the apoptosis rate of N9 cells and PC12 cells in miR-369-3p+high dose procaine group increased, the expression of cleaved Caspase-3 protein increased, the content of MDA and ROS increased, the activity of SOD decreased, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Procaine can reduce hypoxia induced injury to N9 and PC12 cells, and its mechanism may be related to inhibiting the expression of miR-369-3p.

[**KEY WORDS**] procaine; miR-369-3p; N9 cells; PC12 cells; apoptosis; ischemic stroke

缺血性脑卒中是比较常见的脑血管疾病,脑组织缺血缺氧时极易引起神经细胞损伤,神经细胞凋亡、炎症反应及氧化应激等是脑缺血造成神经损伤的重要机制^[1-2]。因此,寻找缺氧引起神经损伤的治疗方法对于防治缺血性脑卒中具有重要意义。研究表明麻醉药具有神经保护作用^[3]。普鲁卡因除可用于局部麻醉外,还可用于治疗神经系统疾病^[4]、神经病理性疼痛^[5]、心肌细胞缺氧损伤^[6]等。这些研究都表明普鲁卡因具有多种药理作用,但其对缺氧环境诱导的 N9 细胞、PC12 细胞凋亡的作用及其机制还鲜有报道。微小 RNA (microRNA, miRNA) 通过在转录后水平调控基因表达参与多种细胞过程。吕喆等^[7]研究发现,抑制 miR-369-3p 表达可促进缺氧环境下海马神经元细胞增殖,抑制细胞凋亡,改善氧化应激损伤。PC12 细胞作为一种大鼠肾上腺髓质细胞瘤细胞,其细胞膜上具有能诱导神经突起形成的神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 受体,故该细胞目前已经广泛用于神经系统疾病的细胞水平研究^[8]。N9 细胞是小胶质细胞,是巨噬细胞的一种,主要分布在中枢神经系统,有研究证明缺血性脑卒中时小胶质细胞的激活和炎症因子的参与诱发了炎症反应^[9]。因此,本研究探讨普鲁卡因对缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞损伤的影响,并探讨其机制是否与调控 miR-369-3p 表达有关,旨在为缺血性脑卒中的治疗提供潜在策略。

1 材料和方法

1.1 实验细胞、主要材料与试剂

PC12 细胞由中国科学院细胞库提供;小鼠 N9 细胞购自美国 ATCC 公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;盐酸普鲁卡因、凋亡检测试剂盒、蛋白提取试剂盒购自金克隆 (北京) 生物技术有限公司;丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量检测试剂

盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) ELISA 试剂盒购自武汉默沙克生物科技有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒购自晶美生物工程 (北京) 有限公司;miRNA 提取试剂盒购自上海翌立生物科技股份有限公司;RT-qPCR 试剂盒 (SYBR Green) 购自 Sigma-Aldrich 公司;兔抗鼠 cleaved Caspase-3 一抗由美国 CST 公司提供。

1.2 细胞处理与分组

N9 细胞、PC12 细胞用 RPMI 1640 培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的细胞培养箱中进行培养,取其对应数长期细胞,将其置于含 94% N_2 、5% CO_2 、1% O_2 条件下进行缺氧培养 48 h,作为缺氧组;常规培养的细胞作为对照组;将 N9 细胞、PC12 细胞分别用 2、6 及 18 mg/L 普鲁卡因孵育,之后对细胞进行缺氧处理,将处理后的细胞分为低、中、高剂量普鲁卡因组;用不含血清的培养基分别稀释转染质粒与 Lipofectamin2000,混匀后与 N9 细胞、PC12 细胞室温孵育 5 min,进行细胞转染,之后进行缺氧处理,作为 anti-miR-con 组、anti-miR-369-3p 组,anti-miR-con 为干扰 miR-369-3p 的空载体,anti-miR-369-3p 可干扰 miR-369-3p 的表达,上游引物序列为 5'-AAUAAUACAUGGUUGAUCUU-3',下游引物序列为 5'-CUUAGUACGCGGUTGAUCTUA-3';将 miR-con、miR-369-3p 转染后的细胞用 18 mg/L 普鲁卡因进行干预,之后进行缺氧处理,作为 miR-con+高剂量普鲁卡因组、miR-369-3p+高剂量普鲁卡因组。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡

收集 N9 细胞、PC12 细胞,PBS 漂洗后,用 Binding buffer 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI 孵育避光 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达

用 RIPA 裂解液提取总蛋白,通过 BCA 法定

量,并进行凝胶电泳,转膜封闭后加入兔抗鼠 cleaved Caspase-3 一抗(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,清洗膜后加入相应二抗(1:3 000),室温孵育 2 h,最后显影、成像,以 β -actin 为内参,分析目标蛋白的表达水平。

1.5 细胞中 MDA、ROS 含量及 SOD 活性检测

各组细胞培养 48 h 后,收集细胞,分别按照 MDA、ROS 和 SOD 试剂盒说明,酶标仪检测 450 nm 处光密度(optical density, OD)值,根据各自标准品制作的标准曲线计算 MDA、ROS 含量及 SOD 活性。

1.6 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平检测

各组细胞培养 48 h 后,1 000 r/min 离心 5 min,取上清液,根据 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 试剂盒说明,测量 450 nm 处的 OD 值,TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平通过标准溶液预先制作的标准曲线进行归一化。

1.7 RT-qPCR 检测 miR-369-3p 表达

各组 N9 细胞、PC12 细胞用 miRNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,反转录生成 cDNA 后进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系 20 μ L,其中包含 10 μ L 2 \times Master mix,8 μ L 稀释的 cDNA 和 0.5 μ L 上游和下游引物。反应条件:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 1 min,67 ℃ 延伸 30 s,循环 40 次,进行 PCR 扩增,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算相对表达量。miR-369-3p 上游引物序列为 5'-TCTGGACGACGAA TGTTC-3',下游引物序列为 5'-GATACGGACGGC

TAGTGG-3';U6 上游引物序列为 5'-CTCGCTTCGG CAGCACA-3',下游引物序列为 5'-AACGCTTCACG AATTTGCGT-3'。

1.8 统计学分析

数据采用 SPSS 25.0 软件进行分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度普鲁卡因对缺氧处理的 N9 细胞、PC12 细胞凋亡的影响

与对照组相比,缺氧组 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平上升($P<0.05$);与缺氧组相比,低、中、高剂量普鲁卡因组 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平下降($P<0.05$),且均呈浓度依赖性(图 1 和图 2)。

2.2 普鲁卡因对缺氧处理的 N9 细胞、PC12 细胞氧化应激和炎症因子水平的影响

与对照组相比,缺氧组 N9 细胞和 PC12 细胞 SOD 活性降低,MDA、ROS 含量及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高($P<0.05$)。与缺氧组相比,低、中和高剂量普鲁卡因组 N9 细胞和 P12 细胞 SOD 活性升高,MDA、ROS 含量及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低($P<0.05$),其降低趋势呈浓度依赖性(表 1 和表 2)。

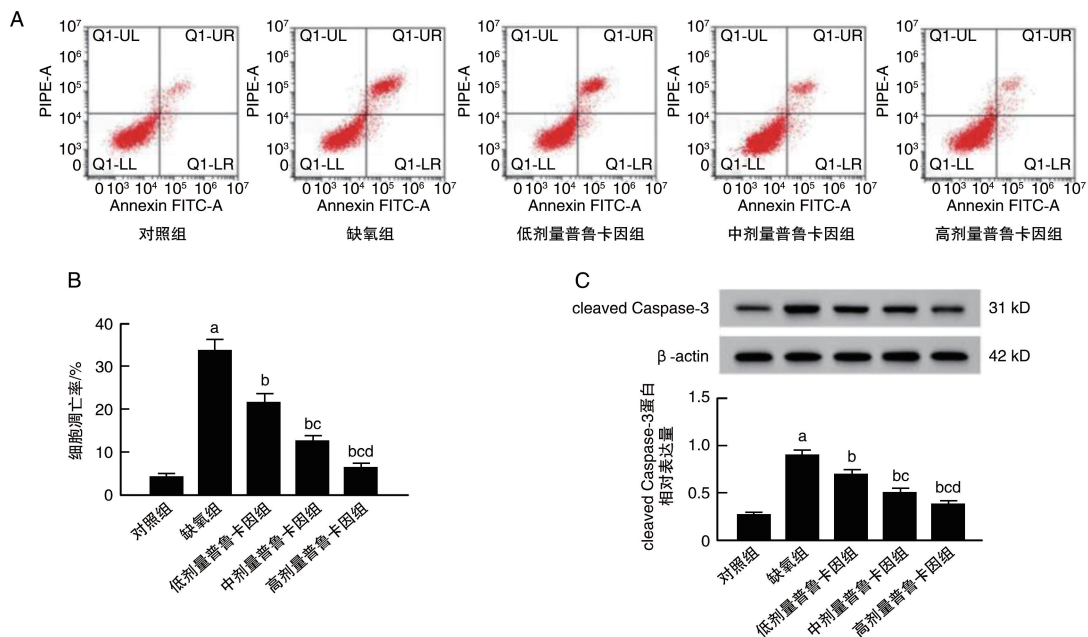


图 1. 不同浓度普鲁卡因对缺氧处理的 N9 细胞凋亡的影响

A 为流式细胞术检测细胞凋亡,B 为各组 N9 细胞凋亡率比较,C 为 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达。a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与缺氧组比较;c 为 $P<0.001$,与低剂量普鲁卡因组比较;d 为 $P<0.001$,与中剂量普鲁卡因组比较。

Figure 1. Effect of different concentrations of procaine on apoptosis of N9 cells treated with hypoxia

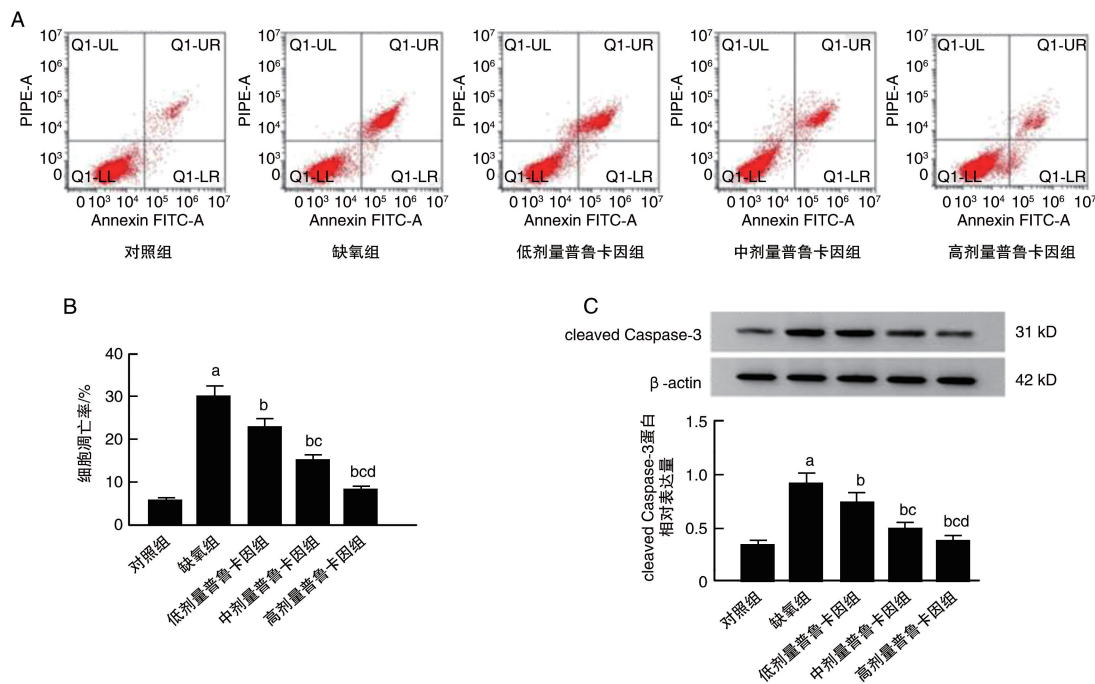


图 2. 不同浓度普鲁卡因对缺氧处理的 PC12 凋亡的影响

A 为流式细胞术检测细胞凋亡, B 为各组 PC12 细胞凋亡率比较, C 为 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与缺氧组比较; c 为 $P < 0.001$, 与低剂量普鲁卡因组比较; d 为 $P < 0.001$, 与中剂量普鲁卡因组比较。

Figure 2. Effect of different concentrations of procaine on apoptosis of PC12 cells treated with hypoxia

表 1. 普鲁卡因对缺氧处理的 N9 细胞氧化应激和炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1. Effects of procaine on oxidative stress and inflammatory factor levels in N9 cells treated with hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

分组	MDA/($\mu\text{mol/g}$)	SOD/(kU/g)	ROS/(g/L)	TNF- α /(ng/L)	IL-1 β /(ng/L)	IL-6/(ng/L)
对照组	0.37 \pm 0.03	17.65 \pm 1.14	116.21 \pm 8.45	31.54 \pm 2.05	77.65 \pm 6.42	15.68 \pm 1.23
缺氧组	2.59 \pm 0.18 ^a	2.88 \pm 0.31 ^a	466.12 \pm 40.23 ^a	120.47 \pm 15.33 ^a	458.32 \pm 39.29 ^a	81.69 \pm 7.68 ^a
低剂量普鲁卡因组	2.01 \pm 0.16 ^b	7.42 \pm 0.65 ^b	352.35 \pm 38.41 ^b	82.12 \pm 9.35 ^b	364.59 \pm 32.48 ^b	65.74 \pm 6.05 ^b
中剂量普鲁卡因组	1.54 \pm 0.14 ^{bc}	12.36 \pm 1.02 ^{bc}	276.34 \pm 25.66 ^{bc}	60.55 \pm 5.84 ^{bc}	283.88 \pm 29.40 ^{bc}	48.95 \pm 4.22 ^{bc}
高剂量普鲁卡因组	0.95 \pm 0.09 ^{bcd}	15.96 \pm 1.33 ^{bcd}	204.58 \pm 18.62 ^{bcd}	43.26 \pm 4.09 ^{bcd}	198.64 \pm 21.34 ^{bcd}	30.25 \pm 2.45 ^{bcd}

注: a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.001$, 与缺氧组比较; c 为 $P < 0.001$, 与低剂量普鲁卡因组比较; d 为 $P < 0.001$, 与中剂量普鲁卡因组比较。

表 2. 普鲁卡因对缺氧处理的 PC12 细胞氧化应激和炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2. Effects of procaine on oxidative stress and inflammatory factor levels in PC12 cells treated with hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

分组	MDA/($\mu\text{mol/g}$)	SOD/(kU/g)	ROS/(g/L)	TNF- α /(ng/L)	IL-1 β /(ng/L)	IL-6/(ng/L)
对照组	0.43 \pm 0.04	15.23 \pm 1.21	105.43 \pm 9.16	26.13 \pm 1.88	83.16 \pm 7.03	12.67 \pm 1.01
缺氧组	2.83 \pm 0.21 ^a	3.02 \pm 0.21 ^a	483.96 \pm 38.12 ^a	115.73 \pm 7.16 ^a	503.76 \pm 45.96 ^a	69.38 \pm 5.04 ^a
低剂量普鲁卡因组	2.15 \pm 0.15 ^b	6.13 \pm 0.55 ^b	375.19 \pm 27.16 ^b	89.37 \pm 7.12 ^b	428.73 \pm 36.91 ^b	51.32 \pm 3.97 ^b
中剂量普鲁卡因组	1.43 \pm 0.11 ^{bc}	9.05 \pm 0.76 ^{bc}	219.73 \pm 15.37 ^{bc}	52.29 \pm 3.98 ^{bc}	317.82 \pm 25.43 ^{bc}	31.08 \pm 2.04 ^{bc}
高剂量普鲁卡因组	0.73 \pm 0.07 ^{bcd}	13.86 \pm 1.04 ^{bcd}	141.37 \pm 10.06 ^{bcd}	37.01 \pm 2.93 ^{bcd}	157.82 \pm 11.12 ^{bcd}	18.11 \pm 1.24 ^{bcd}

注: a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.001$, 与缺氧组比较; c 为 $P < 0.001$, 与低剂量普鲁卡因组比较; d 为 $P < 0.001$, 与中剂量普鲁卡因组比较。

2.3 普鲁卡因对 miR-369-3p 表达的影响

与对照组相比,缺氧组 N9 细胞和 PC12 细胞 miR-369-3p 的表达升高 ($P < 0.05$);与缺氧组相比,低、中和高剂量普鲁卡因组 N9 细胞和 PC12 细胞 miR-369-3p 的表达水平降低,且呈浓度依赖性(表 3)。

2.4 anti-miR-369-3p 对缺氧处理的 N9 细胞、PC12 细胞凋亡、氧化应激和炎症因子水平的影响

与 anti-miR-con 组相比,anti-miR-369-3p 组 N9 细胞和 PC12 细胞 miR-369-3p 的表达降低 ($P < 0.05$),SOD 水平上升,cleaved Caspase-3 蛋白表达水平、细胞凋亡率降低,MDA、ROS 含量及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低(均 $P < 0.05$;图 3、图 4、表 4)。

表 3. 普鲁卡因对 N9 细胞、PC12 细胞 miR-369-3p 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3. Effect of procaine on miR-369-3p expression in N9 and P12 cells($\bar{x} \pm s, n = 9$)

分组	N9 细胞	PC12 细胞
对照组	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.10
缺氧组	2.57 \pm 0.18 ^a	2.86 \pm 0.23 ^a
低剂量普鲁卡因组	1.98 \pm 0.12 ^b	2.02 \pm 0.13 ^b
中剂量普鲁卡因组	1.52 \pm 0.13 ^{bc}	1.80 \pm 0.14 ^{bc}
高剂量普鲁卡因组	1.16 \pm 0.10 ^{bcd}	1.25 \pm 0.14 ^{bcd}

注:a 为 $P < 0.001$,与对照组比较;b 为 $P < 0.001$,与缺氧组比较;c 为 $P < 0.001$,与低剂量普鲁卡因组比较;d 为 $P < 0.001$,与中剂量普鲁卡因组比较。

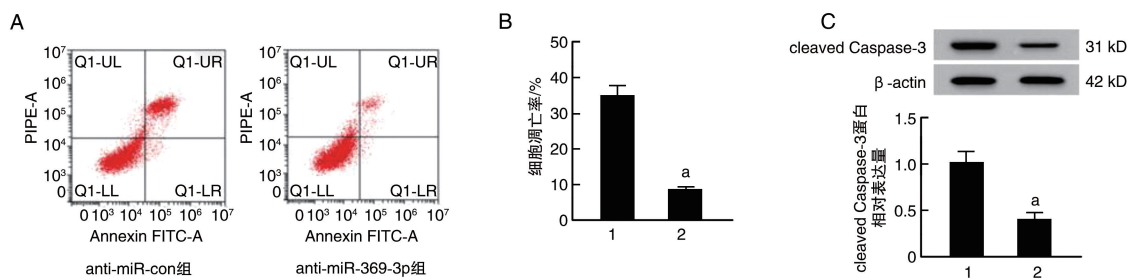


图 3. anti-miR-369-3p 对缺氧处理的 N9 细胞凋亡的影响

1 为 anti-miR-con 组,2 为 anti-miR-369-3p 组。

A 为流式细胞术检测细胞凋亡,B 为各组 N9 细胞凋亡率比较,C 为 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达。

a 为 $P < 0.05$,与 anti-miR-con 组比较。

Figure 3. Effect of anti-miR-369-3p on the apoptosis of N9 cells treated with hypoxia

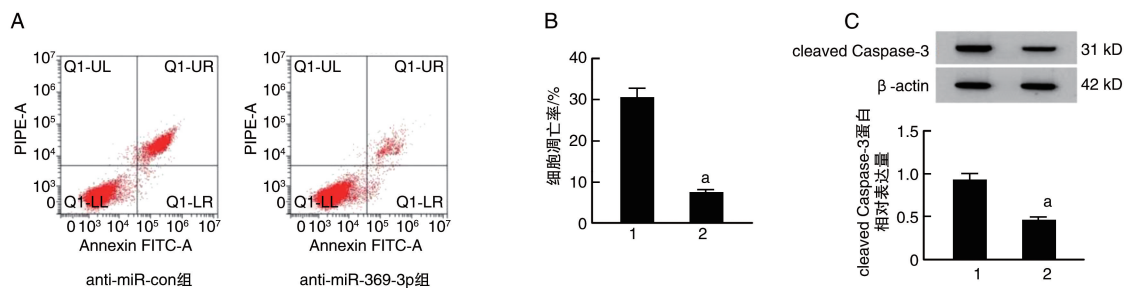


图 4. anti-miR-369-3p 对缺氧处理的 PC12 凋亡的影响

1 为 anti-miR-con 组;2 为 anti-miR-369-3p 组。

A 为流式细胞术检测细胞凋亡,B 为各组 P12 细胞凋亡率比较,C 为 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达。

a 为 $P < 0.05$,与 anti-miR-con 组比较。

Figure 4. Effect of anti-miR-369-3p on the apoptosis of PC12 cells treated with hypoxia

2.5 miR-369-3p 可以拮抗普鲁卡因对缺氧处理的细胞凋亡、氧化应激和炎症因子水平的影响

与 miR-con+高剂量普鲁卡因组相比,miR-369-3p+高剂量普鲁卡因组 N9 细胞和 P12 细胞 miR-369-3p

的表达、细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 的蛋白表达、MDA、ROS 含量及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高,SOD 活性降低(均 $P < 0.05$;图 5、图 6 和表 5)。

表 4. anti-miR-369-3p 对缺氧处理的 N9 细胞和 P12 细胞凋亡、氧化应激和炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 4. Effects of anti-miR-369-3p on apoptosis, oxidative stress and inflammatory factor levels in N9 cells and PC12 cells treated with hypoxia($\bar{x}\pm s, n=9$)

项目	N9 细胞		PC12 细胞	
	anti-miR-con 组	anti-miR-369-3p 组	anti-miR-con 组	anti-miR-369-3p 组
miR-369-3p	1.00±0.00	0.54±0.03	1.00±0.08	0.42±0.04
MDA/($\mu\text{mol/g}$)	3.05±0.24	1.23±0.11 ^a	2.81±0.21	0.96±0.09 ^a
SOD/(kU/g)	2.95±0.22	14.38±1.26 ^a	3.10±0.22	15.15±1.08 ^a
ROS/(g/L)	453.95±47.68	119.37±13.90 ^a	487.64±37.14	109.71±8.39 ^a
TNF- α /(ng/L)	120.64±14.95	46.92±5.07 ^a	112.54±10.35	31.67±2.04 ^a
IL-1 β /(ng/L)	531.62±62.47	96.45±11.34 ^a	501.05±41.57	72.68±6.15 ^a
IL-6/(ng/L)	78.32±8.24	15.94±1.68 ^a	65.77±5.34	11.26±0.94 ^a

注:a 为 $P<0.001$, 与 anti-miR-con 组比较。

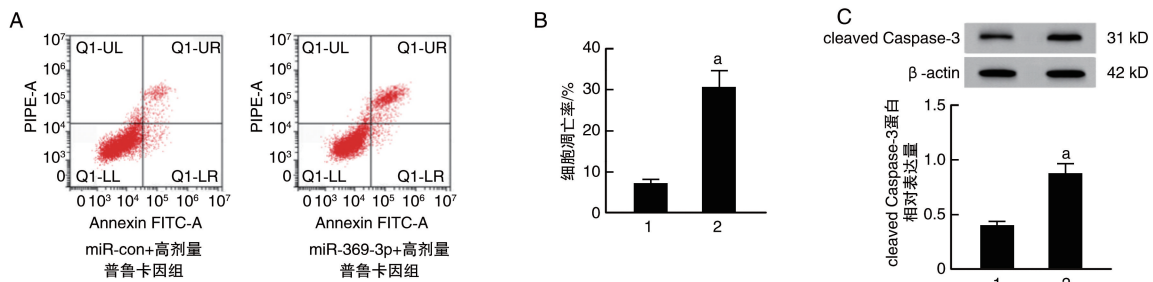


图 5. miR-369-3p 可以拮抗普鲁卡因对缺氧处理的 N9 细胞凋亡的影响

1 为 miR-con+高剂量普鲁卡因组, 2 为 miR-369-3p+高剂量普鲁卡因组。

A 为流式细胞术测细胞凋亡, B 为各组 N9 细胞凋亡率比较, C 为 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达。

a 为 $P<0.05$, 与 miR-con+高剂量普鲁卡因组比较。

Figure 5. miR-369-3p can antagonize the effect of procaine on apoptosis of N9 cells treated with hypoxia

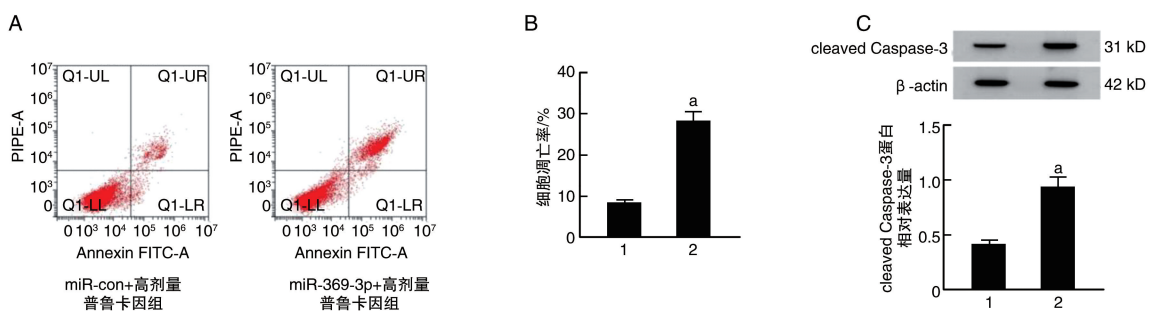


图 6. miR-369-3p 可以拮抗普鲁卡因对缺氧处理的 PC12 细胞凋亡的影响

1 为 miR-con+高剂量普鲁卡因组, 2 为 miR-369-3p+高剂量普鲁卡因组。

A 为流式细胞术测细胞凋亡, B 为各组 PC12 细胞凋亡率比较, C 为 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达。

a 为 $P<0.05$, 与 miR-con+高剂量普鲁卡因组比较。

Figure 6. miR-369-3p can antagonize the effect of procaine on apoptosis of PC12 cells treated with hypoxia

3 讨论

缺血性脑卒中是中枢神经系统损伤最常见的原因之一, 抑制神经炎症和氧化应激对神经有保护作用, 可抗缺血性脑卒中, 因此, 针对氧化应激和神经炎症可能是治疗缺血性脑卒中的一种有前途的

治疗策略^[10-12]。研究表明围术期常用的麻醉药可能具有神经保护作用^[13]。普鲁卡因可通过上调热休克蛋白 27, 抑制过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡, 缓解心肌细胞损伤^[14]。普鲁卡因可明显降低 B-七叶皂苷钠所致的局部组织和静脉损伤^[15]。普鲁卡因可保护 PC12 细胞免受 β -淀粉样蛋白诱导的神经

表 5. miR-369-3p 可以逆转普鲁卡因对缺氧处理的 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡、氧化应激和炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)Table 5. miR-369-3p can reverse the effects of procaine on apoptosis, oxidative stress and inflammatory factor levels in N9 cells and PC12 cells treated with hypoxia($\bar{x}\pm s, n=9$)

项目	N9 细胞		PC12 细胞	
	miR-con+高剂量 普鲁卡因组	miR-369-3p+高剂量 普鲁卡因组	miR-con+高剂量 普鲁卡因组	miR-369-3p+高剂量 普鲁卡因组
miR-369-3p	1.00±0.00	2.36±0.19	1.00±0.12	2.15±0.18
MDA/($\mu\text{mol/g}$)	0.63±0.07	1.94±0.16 ^a	0.75±0.07	2.72±0.23 ^a
SOD/(kU/g)	15.68±1.70	6.45±0.82 ^a	13.81±1.12	2.93±0.24 ^a
ROS/(g/L)	178.24±20.66	422.27±48.61 ^a	143.06±11.15	502.71±42.61 ^a
TNF- α /(ng/L)	45.72±5.03	168.43±18.90 ^a	37.12±3.14	123.25±11.37 ^a
IL-1 β /(ng/L)	189.35±19.37	466.32±50.82 ^a	161.93±10.94	473.02±39.16 ^a
IL-6/(ng/L)	21.25±2.26	69.48±7.24 ^a	18.05±1.31	75.96±6.83 ^a

注:a 为 $P<0.001$, 与 miR-con+高剂量普鲁卡因组比较。

毒性^[16]。以上研究表明普鲁卡因可能具有抗氧化损伤及神经毒性的作用。

根据报道,氧化应激和炎症是缺氧诱导损伤的重要机制^[17-18]。缺氧会增加细胞内 ROS 产生,从而促进氧化应激,还可诱导细胞凋亡^[19]。在缺氧期间,过量的 ROS 会直接破坏抗氧化酶(如 SOD),并降低其活性,从而进一步加剧细胞内的氧化应激。此外,ROS 可以与细胞膜中的多不饱和脂质相互作用,形成 MDA,后者被广泛认为是脂质过氧化的标志物^[20]。苏长英等^[21]研究发现桑葚提取物通过减少促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 等的分泌降低脂多糖诱导的心肌细胞炎症反应。本研究用缺氧诱导 N9 细胞、PC12 细胞模拟神经损伤情况,用不同剂量的普鲁卡因处理后,经缺氧环境诱导的 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡率、MDA、ROS 含量下调,SOD 活性升高,提示普鲁卡因能减轻缺氧环境诱导的 N9 细胞、PC12 细胞凋亡和氧化应激炎症反应。缺氧后,IL-1 β 、IL-6 等促炎因子的表达大幅增加^[22]。此外,ROS 可导致级联炎症反应^[23]。本研究中,N9 细胞、PC12 细胞经缺氧诱导后炎症因子水平明显升高;经不同剂量的普鲁卡因处理后,缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著降低,表明普鲁卡因可抑制缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞炎症反应。因此,普鲁卡因对缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞损伤具有拮抗作用。

已有研究说明槲皮素诱导的 miR-369-3p 可调节慢性炎症反应^[24-25],miR-369 通过靶向瞬时受体电位香草酸 3(transient receptor potential vanilloid 3, TRPV3)减少缺氧诱导的细胞凋亡和炎症反应^[26],提示 miR-369-3p 可能参与调控炎症反应的发生与

发展。本研究发现,经缺氧环境诱导的 N9 细胞、PC12 细胞 miR-369-3p 的表达显著升高;经抑制 miR-369-3p 后,N9 细胞、PC12 细胞凋亡率降低,MDA 和 ROS 含量降低,SOD 活性升高,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低。表明下调 miR-369-3p 既可抑制缺氧环境诱导的 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡、氧化应激反应,还可抑制炎症反应的发生和进展。此外,本研究结果还显示,普鲁卡因可降低 miR-369-3p 的表达,miR-369-3p 过表达可拮抗普鲁卡因对缺氧处理的 N9 细胞和 PC12 细胞凋亡、氧化应激和炎症因子产生的抑制作用。

综上所述,普鲁卡因可减轻缺氧诱导的 N9 细胞、PC12 细胞损伤,其机制可能与抑制 miR-369-3p 的表达有关。

[参考文献]

- [1] 刘伟,丛树艳. 缺血性脑卒中炎症反应标志物的研究现状[J]. 中国临床神经科学, 2020, 28(5): 590-594.
LIU W, CONG S Y. Research status of inflammatory response markers in ischemic stroke[J]. Chin J Clin Neurosc, 2020, 28(5): 590-594.
- [2] 张巧莲,李双英,孙艳,等. 氧化应激与缺血性脑卒中神经功能评分及神经功能恢复的相关性研究[J]. 现代医学, 2019, 47(3): 287-291.
ZHANG Q L, LI S Y, SUN Y, et al. Correlation between oxidative stress and ischemic stroke neurological function score and neurological recovery[J]. Mod Med J, 2019, 47(3): 287-291.
- [3] 胡雨蛟,吴安国,欧册华. 麻醉药物的神经保护作用与神经毒性研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(2): 181-186.
HU Y J, WU A G, OU C H. Research progress on neuroprotection and neurotoxicity of anesthetics [J]. J Southwest Med Univ, 2021, 44(2): 181-186.
- [4] 陈晓燕. 浅论普鲁卡因在临床上的用途[J]. 当代医药论丛,

- 2014, 12(15): 155-156.
CHEN X Y. On the clinical use of procaine [J]. *Contemp Med Forum*, 2014, 12(15): 155-156.
- [5] 李东华, 田英刚, 段勇. 普鲁卡因通过抑制 JAK2/STAT3 通路缓解神经病理性疼痛[J]. *滨州医学院学报*, 2020, 43(4): 241-244.
LI D H, TIAN Y G, DUAN Y. Procaine relieves neuropathic pain by inhibiting JAK2/STAT3 pathway [J]. *J Binzhou Med Univ*, 2020, 43(4): 241-244.
- [6] 赵建力, 刘保江. 普鲁卡因对缺氧心肌细胞的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2001, 32(6): 538-540.
ZHAO J L, LIU B J. Effects of procaine on hypoxic cardiomyocytes [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2001, 32(6): 538-540.
- [7] 吕喆, 蒋晓刚, 廉民学. miR-369-3p 对缺氧诱导海马神经元细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *海南医学*, 2020, 31(16): 2041-2047.
LV Z, JIANG X G, LIAN M X. Effects of miR-369-3p on hypoxia-induced proliferation and apoptosis of hippocampal neurons and its mechanism [J]. *Hainan Med J*, 2020, 31(16): 2041-2047.
- [8] 赵静, 汪惠丽. 镉致 PC12 细胞的神经毒性[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 44(5): 696-699.
ZHAO J, WANG H L. Neurotoxicity of PC12 cells induced by cadmium [J]. *J Hefei Univ of Technol (Nat Sci Ed)*, 2021, 44(5): 696-699.
- [9] 吴娟, 刘冲, 张艳. 小胶质细胞表面 TREM2 受体对缺血性脑卒中的免疫调节机制[J]. *西南国防医药*, 2021, 31(3): 257-259.
WU J, LIU C, ZHANG Y. Immunoregulatory mechanism of TREM2 receptor on microglia surface on ischemic stroke [J]. *Southwest Nat Def Med*, 2021, 31(3): 257-259.
- [10] ZHANG D, FENG Y, PAN H, et al. 9-Methylfascaplysin exerts anti-ischemic stroke neuroprotective effects via the inhibition of neuroinflammation and oxidative stress in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021(97): 107656.
- [11] YANG C, HAWKINS K E, DORÉ S, et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2): C135-C153.
- [12] ZHU H, HU S, LI Y, et al. Interleukins and ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 828447.
- [13] 左志义. 麻醉药诱导的神经保护——从基础到临床[J]. *北京医学*, 2018, 40(6): 504-505.
ZUO Z Y. Anesthetic-induced neuroprotection: from basic to clinical [J]. *Beijing Med J*, 2018, 40(6): 504-505.
- [14] 俞晓东, 林慧, 付强, 等. 普鲁卡因对 H₂O₂ 诱导心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(14): 2025-2028.
YU X D, LIN H, FU Q, et al. Protective effect of procaine on H₂O₂-induced myocardial cell oxidative stress injury [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2020, 36(14): 2025-2028.
- [15] 代国兰. 普鲁卡因对 B-七叶皂苷钠致局部组织和静脉损伤的保护作用研究[J]. *护士进修杂志*, 2010, 25(1): 67-68.
DAI G L. Study on the protective effect of procaine on local tissue and vein injury induced by B-escin sodium[J]. *J Nurs Adv Study*, 2010, 25(1): 67-68.
- [16] LECANU L, WENGUO Y, XU J, et al. Local anesthetic procaine protects rat pheochromocytoma PC12 cells against β -amyloid-induced neurotoxicity[J]. *Pharmacology*, 2005, 74(2): 65-78.
- [17] 丛光燕, 吕鸿燕, 梁正玲, 等. 丁苯酞对缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(12): 1528-1530.
CONG G Y, LV H Y, LIANG Z L, et al. Protective effect of butylphthalide on hypoxia-hypoglycemia/reoxygenation-reglucose damage to PC12 cells [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(12): 1528-1530.
- [18] BIAN Z, LIU H, XU F, et al. Ursolic acid protects against anoxic injury in cardiac microvascular endothelial cells by regulating intercellular adhesion molecule-1 and Toll-like receptor 4/MyD88/NF- κ B pathway[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271221093626.
- [19] LUO H, SUN W, SHAO J, et al. Protective effect of nitronyl nitroxide against hypoxia-induced damage in PC12 cells [J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(3): 345-353.
- [20] JING L, GAO R, ZHANG J, et al. Norwogonin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 18-29.
- [21] 苏长英, 孙学会, 吴美龄. 桑葚提取物对脂多糖诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(2): 125-129.
SU C Y, SUN X H, WU M L. Effect of mulberry extract on cardiomyocyte inflammatory response and apoptosis induced by lipopolysaccharide[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(2): 125-129.
- [22] ZHOU S, ZHONG Z, HUANG P, et al. IL-6/STAT3 induced neuron apoptosis in hypoxia by downregulating ATF6 expression [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 729925.
- [23] YANG G, ZHAO Y. Overexpression of miR-146b-5p ameliorates neonatal hypoxic ischemic encephalopathy by inhibiting IRAK1/TRAF6/TAK1/NF- α B signaling [J]. *Yonsei Med J*, 2020, 61(8): 660-669.
- [24] GALLEGGIANTE V, DE SANTIS S, LISO M, et al. Quercetin-induced miR-369-3p suppresses chronic inflammatory response targeting C/EBP- β [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(19): 1801390-1801390.
- [25] SCALAVINO V, PICCINNO E, VALENTINI A M, et al. A novel mechanism of immunoproteasome regulation via miR-369-3p in intestinal inflammatory response [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 13771.
- [26] WANG J, CHEN X, HUANG W. MicroRNA-369 attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis and inflammation via targeting TRPV3[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54(3): e10550.
(此文编辑 文玉珊)