



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180602

http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/201909985.pdf

## p38 MAPK抑制剂SB203580减轻罗哌卡因对PC12细胞的毒性

陈园<sup>1</sup>, 王锸<sup>1</sup>, 孙志华<sup>2</sup>, 宋宗斌<sup>1</sup>, 叶治<sup>1</sup>, 张重<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅医院麻醉科, 长沙 410008; 2. 湘雅常德医院麻醉科, 湖南 常德 415000)

**[摘要]** 目的: 探讨p38MAPK抑制剂SB203580对罗哌卡因诱发大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)的毒性的影响及其机制。方法: 将PC12细胞分为对照组(N组)、罗哌卡因组(R组, 15 mmol/L盐酸罗哌卡因)、罗哌卡因+SB203580组(R+S组, 15 mmol/L盐酸罗哌卡因+10 μmol/L SB203580)。培养48 h后行3组细胞计数并采用MTT法检测细胞存活率; 采用蛋白质印迹法检测各组磷酸化p38(p-p38)、活化的caspase-3的表达以及细胞质中细胞色素C(cytochrome C, Cyt C)的含量。结果: 与N组比较, R组和R+S组的PC12细胞数目及细胞存活率均显著减少(均 $P<0.05$ ); 且R+S组的PC12细胞数目和存活率较R组显著上升(均 $P<0.05$ )。与N组比较, R组和R+S组p-p38, 活化的caspase-3的表达以及细胞质中Cyt C的含量显著增加(均 $P<0.05$ ); 与R组比较, R+S组p-p38, 活化的caspase-3的表达以及细胞质中Cyt C的含量明显减少(均 $P<0.05$ )。结论: 抑制p38磷酸化可减轻罗哌卡因对PC12细胞的毒性作用, 其机制可能与减少释放入细胞质的Cyt C和caspase-3的活化有关。

**[关键词]** 罗哌卡因; 毒性; p38MAPK; SB203580; PC12细胞; 细胞色素C; caspase-3

## P38 MAPK inhibitor SB203580 attenuates the toxicity of ropivacaine on PC12 cells

CHEN Yuan<sup>1</sup>, WANG E<sup>1</sup>, SUN Zhihua<sup>2</sup>, SONG Zongbin<sup>1</sup>, YE Zhi<sup>1</sup>, ZHANG Zhong<sup>1</sup>

(1. Department of Anesthesiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Department of Anesthesiology, Xiangya Changde Hospital, Changde Hunan 415000, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effect of SB203580, a p38MAPK specific inhibitor, on ropivacaine-induced cytotoxicity in PC12 cells.

**Methods:** PC12 cells were divided into three groups: the normal group (Group N), cells were cultured for 48 h; the ropivacaine group (Group R), cells were cultured with 15 mmol/L ropivacaine hydrochloride for 48 h; the ropivacaine+SB203580 group (Group R+S), cells were cultured with 15 mmol/L ropivacaine hydrochloride plus 10 μmol/L SB203580 for 48 h. The cell survival rates were detected by MTT assay. The protein levels of cleaved caspase-3, phosphor-p38

收稿日期(Date of reception): 2018-10-15

第一作者(First author): 陈园, Email: candy33840@126.com, ORCID: 0000-0002-1317-3571

通信作者(Corresponding author): 张重, Email: zhangzhong1983@126.com, ORCID: 0000-0002-3691-2138

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(81301043)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81301043).

(p-p38) and cytosolic cytochrome C (Cyt C) were detected by Western blotting.

**Results:** Compared with the Group N, the number and survival rate of PC12 cells in the Group R and the Group R+S were significantly reduced (all  $P < 0.05$ ); the number and survival rate of PC12 cells in the Group R+S were significantly higher than those in the Group R (both  $P < 0.05$ ). Compared with the Group N, the levels of p-p38 and cleaved caspase-3, and the content of cytoplasmic Cyt C in the PC12 cells from the Group R and the Group R+S were significantly enhanced (all  $P < 0.05$ ); compared with the Group R, the levels of p-p38 and cleaved caspase-3, and the content of cytoplasmic Cyt C in the PC12 cells from the Group R+S were decreased (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The ropivacaine-induced cytotoxicity can be attenuated via inhibition of p38MAPK; which is related to decrease in Cyt C content and cleaved caspase-3 expression.

## KEY WORDS

ropivacaine; toxicity; p38MAPK; SB203580; PC12 cells; cytochrome C; caspase-3

作为临床上常用的局部麻醉药物, 罗哌卡因潜在的神经毒性日益受到重视。既往研究<sup>[1]</sup>表明: p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogenactivated protein kinases, p38MAPK)参与利多卡因神经毒性, 且可能与细胞凋亡的线粒体途径密切相关; 但p38MAPK、线粒体介导的细胞凋亡与罗哌卡因细胞毒性的相关性, 并未得到充分证实。本实验拟通过使用p38抑制剂SB203580研究p38磷酸化对罗哌卡因诱导的PC12细胞毒性的影响, 并初步探讨其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要药品、试剂与仪器

盐酸罗哌卡因购自瑞典阿斯利康公司; SB203580购自德国Calbiochem公司; PC12细胞购自上海中国科学院细胞中心; RPMI 1640培养基、马血清购自海克隆生物化学制品(北京)有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; DMSO购自美国Invitrogen公司; 兔抗鼠磷酸化p38(p-p38)抗体、兔抗鼠活化caspase-3多克隆抗体、兔抗鼠细胞色素C(cytochrome C, Cyt C)单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 兔抗鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔二抗购自美国Sigma公司; MTT试剂盒购自北京沃比森科技有限公司; 细胞质/线粒体分离试剂盒购自美国Biovision公司; 酶标仪、SDS PAGE微型凝胶电泳及转膜设备购自美国BioRad公司; ECL检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

### 1.2 细胞培养和分组

PC12细胞接种于50 mL培养瓶中, 用含10%胎牛

血清和5%马血清的RPMI 1640培养基, 置37 °C和5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 每2~3 d常规传代。

将细胞制成细胞悬液后分为3组: 对照组(N组)、罗哌卡因组(R组)、罗哌卡因+SB203580组(R+S组)。N组无试验药物干预, R组和R+S组分别以盐酸罗哌卡因15 mmol/L、盐酸罗哌卡因15 mmol/L+SB203580 10  $\mu$ mol/L进行处理。3组细胞培养48 h后行细胞计数、MTT法和蛋白质印迹法检测。

### 1.3 MTT法

各组细胞处理48 h后接种于96孔板中, 细胞贴壁后各孔加入50  $\mu$ L 1 $\times$ MTT, 37 °C下孵育4 h, 弃上清液, 各孔加入150  $\mu$ L DMSO, 震荡摇匀; 酶标仪在550 nm波长处检测各孔光密度值(OD值), 取各测试孔OD值与空白药物孔OD值的差值。细胞存活率=加药组D(550 nm)/对照组D(550 nm) $\times$ 100%。

### 1.4 蛋白质印迹法

收集各组细胞, 并将每组细胞均分装成两管: 一管加入细胞裂解液混匀, 离心, 放入沸水中加热变性5 min后取上清液, 提取细胞总蛋白; 另一管使用细胞质/线粒体分离试剂盒提取细胞质中蛋白质(具体步骤参考说明书)。采用BCA法测定蛋白质的浓度。加上样缓冲液混匀后, 放入沸水中加热变性5 min。上样行SDS-PAGE后, 将蛋白转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。分别加入抗p-p38(1:1 000), 抗caspase-3(1:1 000), 抗Cyt C(1:1 000)一抗4 °C过夜, 抗兔二抗(1:10 000)室温下孵育1 h, 用TBST洗涤后显色, 采用Scion Image图像分析系统对蛋白条带进行检测分析。目的蛋白与内参蛋白条带的灰度比值为蛋白的相对含量。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS19.0软件对数据进行分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA); 两两比较使用SNK-*q*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PC12细胞计数及细胞存活率

与N组比较, R组和R+S组的PC12细胞数目及细胞存活率均显著减少(均 $P<0.05$ ); 且R+S组的PC12细胞数目和存活率较R组显著上升(均 $P<0.05$ , 图1)。

与N组相比, R组和R+S组的PC12细胞数目及存活率均显著减少(均 $P<0.05$ ); 且R+S组的PC12细胞数目和存活率较R组显著上升(均 $P<0.05$ , 图2)。

### 2.2 p-p38和活化的caspase-3表达以及细胞质中Cyt C蛋白含量

与N组比较, R组和R+S组p-p38, 活化的caspase-3的表达以及细胞质中Cyt C的含量显著增加(均 $P<0.05$ ); 与R组比较, R+S组p-p38, 活化的caspase-3的表达以及细胞质中Cyt C的含量明显减少(均 $P<0.05$ , 图3)。

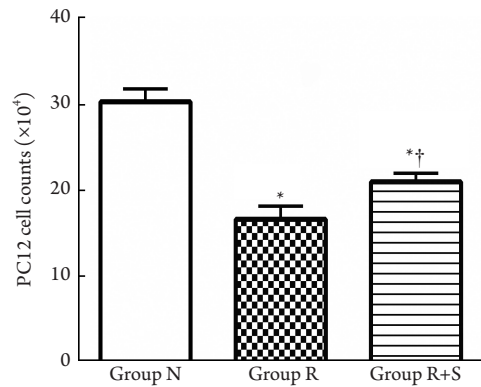


图1 各组PC12细胞计数的比较

Figure 1 Comparison of PC12 cell counts among groups

\* $P<0.05$  vs the Group N; † $P<0.05$  vs the Group R

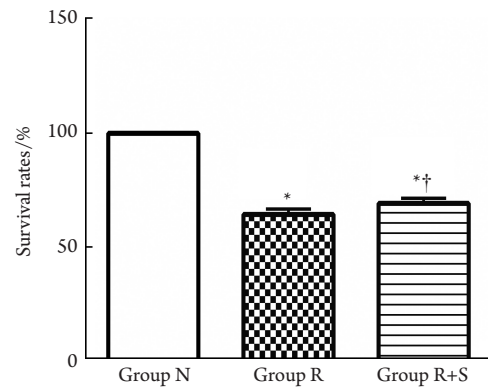


图2 各组PC12细胞存活率的比较

Figure 2 Comparison of survival rates of PC12 cells among groups

\* $P<0.05$  vs the Group N; † $P<0.05$  vs the Group R

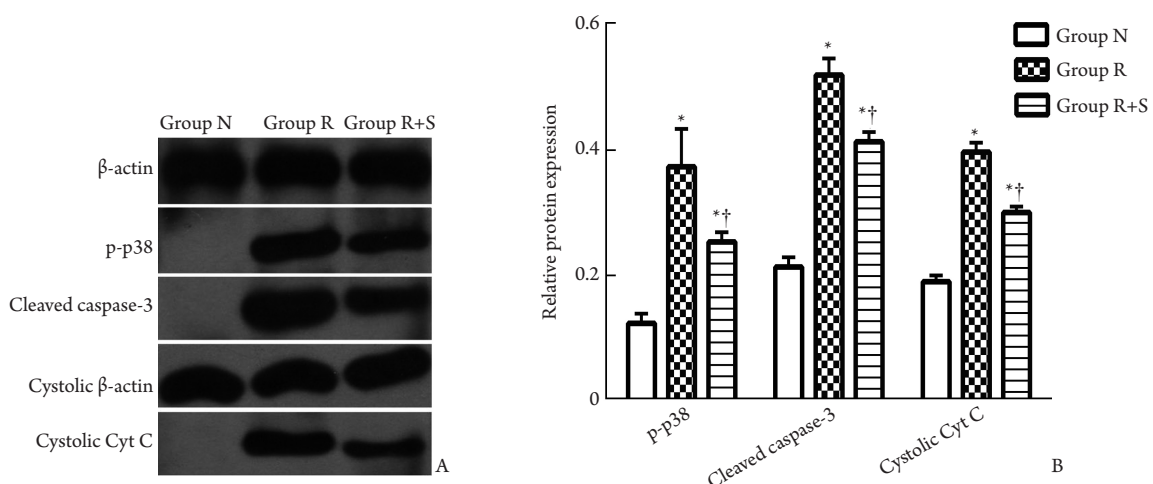


图3 各组细胞p-p38、活化caspase-3蛋白和细胞质中Cyt C的表达

Figure 3 Protein expressions of p-p38, cleaved caspase-3, and cystolic Cyt C in each group

A: Representative electrophorogram of p-p38, cleaved caspase-3, and cystolic Cyt C in each group; B: Comparison of relative protein expression of p-p38, cleaved caspase-3 and cystolic Cyt C among groups. \* $P<0.05$  vs the Group N; † $P<0.05$  vs the Group R

### 3 讨论

SB203580是p38MAPK的选择性抑制剂,广泛应用于相关通路的研究。笔者在参考了Lirk等<sup>[2]</sup>的研究并进行预实验摸索后,选取MAPK家族表达稳定且常用于局部麻醉药物毒性研究的PC12细胞,采用15 mmol/L盐酸罗哌卡因干预48 h建立细胞毒性模型。

在盐酸罗哌卡因处理后的PC12细胞计数及细胞存活率均明显下降,活化的caspase-3表达和细胞质中Cyt C含量均明显增加;表明罗哌卡因可诱导PC12细胞凋亡,并且细胞凋亡的线粒体途径可能参与其中。罗哌卡因作为应用广泛的局部麻醉药物,对其细胞毒性机制及干预措施的研究仍处于探索阶段<sup>[3]</sup>。目前研究发现罗哌卡因的毒性可能与其诱导细胞凋亡密切相关。线粒体途径是哺乳动物经典的细胞凋亡途径之一,线粒体外膜透化是其中的关键环节。线粒体内的Cyt C等透过线粒体膜释放至细胞质,触发caspase级联反应,最终激活caspase-3前体,介导细胞凋亡<sup>[4]</sup>。本课题组既往研究<sup>[5]</sup>的电镜结果显示:罗哌卡因可诱发脊髓细胞线粒体形态学的明显改变;Wang等<sup>[6]</sup>使用罗哌卡因干预非小细胞肺癌细胞后发现线粒体受损、Cyt C释放和caspase-3活化明显增加;此外,罗哌卡因可诱发心肌细胞产生与药物浓度相关的线粒体肿胀<sup>[7]</sup>。上述研究结果均提示罗哌卡因诱导的细胞凋亡与线粒体途径密切相关。

本研究进一步发现:抑制p38MAPK磷酸化可明显缓解PC12细胞数量和细胞存活率的下降程度,同时也减少了caspase-3的活化与Cyt C的释放;提示p38MAPK途径是罗哌卡因诱导细胞毒性的重要机制之一,并且抑制该途径可能减少线粒体介导的细胞凋亡。细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的增加<sup>[8]</sup>以及钙调蛋白激酶<sup>[9]</sup>、Akt信号通路<sup>[10]</sup>、Fas/FasL途径<sup>[11]</sup>的激活等,均可能与罗哌卡因的细胞毒性相关。p38MAPK作为重要细胞信号通路之一,在细胞凋亡、炎症反应和神经损伤等方面发挥重要作用<sup>[12-13]</sup>,但它与罗哌卡因毒性的关系尚有争议:既往有研究<sup>[14-16]</sup>支持罗哌卡因增加了细胞p38MAPK的磷酸化,然而也有学者<sup>[6]</sup>认为罗哌卡因激活了非小细胞癌细胞的MAPK途径但并未改变p38MAPK和其磷酸化产物的表达。研究<sup>[17]</sup>指出:激活p38MAPK可以上调Bcl-2基因家族的Bax/Bcl-2的比值,诱导caspase-3的激活,进而促使线粒体介导的细胞凋亡,上述途径可能为p38MAPK影响细胞凋亡线粒体途径的重要机制之一。

由于本实验为PC12细胞的离体实验,影响因素单一,缺乏内环境的调控,因此不能充分反映罗哌卡因在机体中对神经细胞的影响。另外,本研究未

检测p38MAPK途径的上、下游信号分子及靶向调控的相关节点。因此,罗哌卡因所致的线粒体介导的细胞凋亡中p38MAPK的具体信号通路以及如何靶向干预其上、下游途径,是进一步研究的方向。

综上所述,p38MAPK信号通路在罗哌卡因细胞毒性中发挥重要作用,线粒体介导的细胞凋亡可能为其途径之一,但具体机制有待进一步研究。

**利益冲突声明:**作者声称无任何利益冲突。

### 参考文献

- [1] Haller I, Hausott B, Tomaselli B, et al. Neurotoxicity of lidocaine involves specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase, but not extracellular signal-regulated or c-jun N-terminal kinases, and is mediated by arachidonic acid metabolites[J]. *Anesthesiology*, 2006, 105(5): 1024-1033.
- [2] Lirk P, Haller I, Peter H, et al. In Vitro, inhibition of mitogen-activated protein kinase pathways protects against bupivacaine- and ropivacaine-induced neurotoxicity[J]. *Anesth Analg*, 2008, 106(5): 1456-1464.
- [3] Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, et al. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line[J]. *Br J Anaesth*, 2009, 103(5): 711-718.
- [4] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 770-776.
- [5] Zhong Z, Qulian G, Yuan Z, et al. Repeated intrathecal administration of ropivacaine causes neurotoxicity in rats[J]. *Anaesth Intensive Care*, 2009, 37(6): 929-936.
- [6] Wang HW, Wang LY, Jiang L, et al. Amide-linked local anesthetics induce apoptosis in human non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(10): 2748-2757.
- [7] Hiller N, Mirtschink P, Merkel C, et al. Myocardial accumulation of bupivacaine and ropivacaine is associated with reversible effects on mitochondria and reduced myocardial function[J]. *Anesth Analg*, 2013, 116(1): 83-92.
- [8] Sung CM, Hah YS, Kim JS, et al. Cytotoxic effects of ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on rotator cuff tenofibroblasts[J]. *Am J Sports Med*, 2014, 42(12): 2888-2896.
- [9] Wen X, Lai X, Li X, et al. The effects of ropivacaine hydrochloride on the expression of CaMK II mRNA in the dorsal root ganglion neurons[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 2014-2019.
- [10] Sun Z, Liu H, Guo Q, et al. In vivo and in vitro evidence of the neurotoxic effects of ropivacaine: the role of the Akt signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(6): 1455-1459.
- [11] 罗昭, 刘颖, 张杨, 等. Fas/FasL在罗哌卡因致PC12细胞凋亡中



- 的表达[J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(4): 372-375.
- LUO Zhao, LIU Ying, ZHANG Yang, et al. Expression of Fas/FasL in PC12 cell apoptosis induced by ropivacaine[J]. Journal of Clinical Anesthesiology, 2018, 34(4): 372-375.
- [12] 姜慧, 陈永权, 刘金涛. p38MAPK信号通路在大鼠幻肢痛中的作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(6): 589-593.
- JIANG Hui, CHEN Yongquan, LIU Jintao. Role of p38MAPK signaling pathway in rats with phantom limb pain[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2018, 43(6): 589-593.
- [13] 邓佳, 石钰, 张喜洋, 等. p38丝裂原活化蛋白激酶信号通路在阻滞剂HOE642对肺缺血再灌注保护中的作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(7): 749-754.
- DENG Jia, SHI Yu, ZHANG Xiyang, et al. Role of p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway in lung ischemia-reperfusion protection offered by HOE642[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2017, 42(7): 749-754.
- [14] Sung CM, Hah YS, Kim JS, et al. Cytotoxic effects of ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on rotator cuff tenofibroblasts[J]. Am J Sports Med, 2014, 42(12): 2888-2896.
- [15] Kim RJ, Hah YS, Kang JR, et al. Antioxidant's cytoprotective effects on rotator cuff tenofibroblasts exposed to aminoamide local anesthetics[J]. J Orthop Res, 2015, 33(7): 1001-1007.
- [16] Yan X, Li Y, Han X, et al. Ropivacaine regulates the expression and function of heme oxygenase-1[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 284-289.
- [17] Xing W, Chen DT, Pan JH, et al. Lidocaine induces apoptosis and suppresses tumor growth in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in a xenograft model in vivo[J]. Anesthesiology, 2017, 126(5): 868-881.

(本文编辑 郭征)

本文引用: 陈园, 王镠, 孙志华, 宋宗斌, 叶治, 张重. p38 MAPK抑制剂SB203580减轻罗哌卡因对PC12细胞的毒性[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(9): 985-989. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180602

**Cite this article as:** CHEN Yuan, WANG E, SUN Zhihua, SONG Zongbin, YE Zhi, ZHANG Zhong. P38 MAPK inhibitor SB203580 attenuates the toxicity of ropivacaine on PC12 cells[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2019, 44(9): 985-989. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180602