

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.016.html

异丙酚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时自噬的影响

汤为香¹ 沈玉君² 李元海¹ 沈玉先²

摘要 目的 评价异丙酚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时自噬的影响。方法 健康成年雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 240~280 g, 采用随机数字表法, 将 SD 大鼠随机分为 5 组 ($n=10$): 假手术组 (S 组); 异丙酚单独给药组 (P 组): 经股静脉以 12 mg/(kg·h) 持续泵注 1% 异丙酚 45 min; 肝脏缺血再灌注组 (HIR 组): 血管夹钳夹支配肝左叶、中叶的肝蒂, 造成 70% 肝脏缺血, 1 h 后放开血管夹恢复血供造成缺血再灌注损伤; 异丙酚预处理组 (PHIR 组): 于缺血前 30 min 经股静脉泵注异丙酚 12 mg/(kg·h) 30 min 至缺血 15 min; 脂肪乳预处理组 (IHIR 组): 于缺血前 30 min 经股静脉泵注脂肪乳 1.2 ml/(kg·h) 30 min 至缺血 15 min。于再灌注 6 h 时, 处死大鼠取腹主动脉血测血清谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的活性, 取肝左叶肝脏采用 Western blot 法检测自噬标志物 LC3-II、LC3-I 及 Beclin-1 的表达水平。结果 电镜显示, S 组细胞结构正常, 未见自噬体, 而 HIR 组可见大量自噬体及自噬溶酶体, PHIR 组细胞结构基本正常, 少见自噬体; 与 S 组相比, HIR 组肝细胞电镜下见大量富含血清 ALT 和 AST 活性增高, 肝组织 LC3-II / LC3-I 比值及 Beclin-1 表达上调 ($P<0.05$), P 组各项指标差异无统计学意义; 与 HIR 组相比, PHIR 组血清 ALT 和 AST 活性显著降低, 肝组织 LC3-II / LC3-I 比值及 Beclin-1 表达显著下调 ($P<0.05$), 而 IHIR 组各项指标差异无统计学意义。结论 异丙酚预处理减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤机制可能与抑制肝细胞自噬激活有关。

关键词 异丙酚; 肝脏; 缺血再灌注损伤; 自噬

中图分类号 R 33; R 614.1; R 971+.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)12-1819-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.016

异丙酚作为一种快速短效的静脉麻醉药, 被广泛应用于临床各种手术麻醉。近年来研究^[1]显示异丙酚在肝脏缺血再灌注损伤发生发展过程中有一定保护作用。自噬是真核生物细胞内降解损伤、衰

老细胞器或变性蛋白质维持体内平衡的细胞自我消化过程, 在肝脏缺血再灌注损伤中, 自噬加强损伤蛋白的清除及能源物质回收, 允许细胞应对营养饥饿与缺氧, 促进细胞存活, 但是过度自噬会导致正常蛋白及细胞器过度降解, 损伤细胞^[2-3]。该课题组前期研究^[4]显示异丙酚减轻人肝细胞氧糖剥夺-复氧复糖损伤的机制可能与抑制自噬有关。该研究拟探究异丙酚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器 1% 异丙酚 (瑞典 AstraZeneca 公司); 脂肪乳 (华瑞制药有限公司); 谷草转氨酶 (Aspartate transaminase, AST)、谷草转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 兔抗 LC3 抗体 (美国 Sigma 公司); 兔抗 Beclin-1 抗体 (美国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 GAPDH 抗体 (上海康成生物公司); HRP 标记的猪抗兔 IgG (丹麦 DAKO 公司); 超高灵敏度增强型化学发光底物 A、B 显色剂 (美国 Thermo Scientific Pierce 公司); BCA 法蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 透射电镜 (日本松下, JEM-1230 型)。

1.2 实验动物 健康成年雄性 SD 大鼠 50 只, SPF 级, 240~280 g, 由安徽省实验动物中心提供。

1.3 动物模型建立 术前 12 h 禁食, 自由饮水。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 20 mg/kg 麻醉后, 腹正中切口, 分离显露肝门。按照文献^[3]方法, 用无损伤动脉夹缓慢钳夹供应肝左叶、肝中叶的门静脉和肝动脉血管即第一肝门, 造成 70% 肝脏缺血。观察肝左叶和肝中叶表面颜色变灰白、质地变软, 表明肝脏缺血成功。阻断 1 h, 放开无损伤动脉夹, 再灌注 6 h, 取腹主动脉血 5 ml, 取血后立即处死大鼠, 切除肝脏。取部分肝左叶, 切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小 4~5 块, 浸于 2.5% 戊二醛中固定 4~6 h, 用于电镜检查; 其余肝组织于 -80℃ 备用。

1.4 实验分组 采用随机数字表法, 将大鼠随机分为 5 组 ($n=10$): 假手术组 (S 组): 腹正中切口, 分

2017-09-12 接收

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (编号: 20133420110009)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院麻醉科, 合肥 230022

² 安徽医科大学生物药物研究所, 合肥 230032

作者简介: 汤为香, 女, 住院医师;

李元海, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

liyuanhai-1@163.com

离显露肝门不阻断;异丙酚单独给药组(P组):腹正中切口,分离显露肝门不阻断,经右股静脉以 12 mg/(kg·h)泵注异丙酚 45 min;异丙酚预处理组(PHIR组):于缺血前 30 min 经右股静脉以 12 mg/(kg·h)泵注异丙酚至缺血 15 min;脂肪乳预处理组(IHIR组):以 PHIR 组相同方式给予等体积脂肪乳;肝脏缺血再灌注组(HIR组):以 PHIR 组相同方式给予等体积生理盐水。

1.5 肝功能测定 按照试剂盒说明书采用放射免疫法分别测定血清 ALT 和 AST。

1.6 透射电镜检查 戊二醛固定的肝组织,PBS 浸泡洗涤 2~12 h,1% 锇酸固定,梯度乙醇脱水,置换、包埋、超薄切片(片厚 70 nm)醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,透射电镜观察摄片。

1.7 肝脏 Beclin-1 及 LC3 蛋白的表达水平测定 RIPA 裂解液提取肝组织总蛋白,BCA 法测定蛋白总量。计算上样量后,进行 SDS-PAGE 电泳、转膜。含 5% 脱脂奶粉的 PBST(含 0.05% 吐温的盐酸盐缓冲液)室温封闭 30 min,PBST 洗膜 10 min,重复 3 次,分别加入兔抗 Beclin-1 抗体(稀释度 1:2 000)、兔抗 LC3 抗体(稀释度 1:2 000),于 4℃ 孵育过夜。PBST 洗膜 10 min,重复 3 次,分别滴加 1:2 000 HRP 标记的猪抗兔 IgG,室温摇动 1 h 并洗膜 10 min,重复 3 次;超高灵敏度增强型化学发光底物 A、B 显色剂按 1:1 比例混匀后滴加于膜上,显色曝光,HRP 标记的 GAPDH 为内参。采用 Image J 软件测定条带灰度值,以 Beclin-1 蛋白条带灰度值与 GAPDH 灰度值的比值反映 Beclin-1 蛋白的表达水平,LC3-II 蛋白条带灰度值与 LC3-I 蛋白条带灰度值比值反映 LC3 的激活程度。每个标本每个指标重复测量 3 次取平均值。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计

分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 测定 结果表明,与 S 组相比,HIR 组血清 ALT 和 AST 活性显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),P 组差异无统计学意义;与 HIR 组相比,PHIR 组血清 ALT 和 AST 活性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 IHIR 组差异无统计学意义。见表 1。

表 1 5 组大鼠血清 ALT、AST 的比较($n=10 \bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)
S	45.4 ± 2.2	87.0 ± 2.7
P	47.0 ± 2.4	84.7 ± 2.9
HIR	193.2 ± 4.2 [*]	267.4 ± 4.3 [*]
PHIR	83.0 ± 3.1 [#]	161.2 ± 2.8 [#]
IHIR	194.4 ± 3.7	265.8 ± 4.9
F 值	554.3	628.4

与 S 组比较:^{*} $P < 0.05$;与 HIR 组比较:[#] $P < 0.05$

2.2 电镜下肝细胞自噬现象的形态学表现 S 组:线粒体结构正常,嵴完整,粗面内质网结构完整,排列整齐;HIR 组:可见单层膜的无定型团状物质及部分膜状结构的类圆形不均质小体,即自噬溶酶体(AV),其包含破碎线粒体、内质网、糖原或其他细胞器及胞浆成分;PHIR 组:线粒体无明显肿胀,结构基本完整,嵴少有断裂,粗面内质网较多。见图 1。

2.3 肝脏 Beclin-1 及 LC3 蛋白的表达水平 结果表明:与 S 组相比,HIR 组肝组织 Beclin-1 及 LC3-II 蛋白水平显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。P 组差异无统计学意义。与 HIR 组相比,PHIR 组肝组织 Beclin-1 及 LC3-II 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 IHIR 组差异无统计学

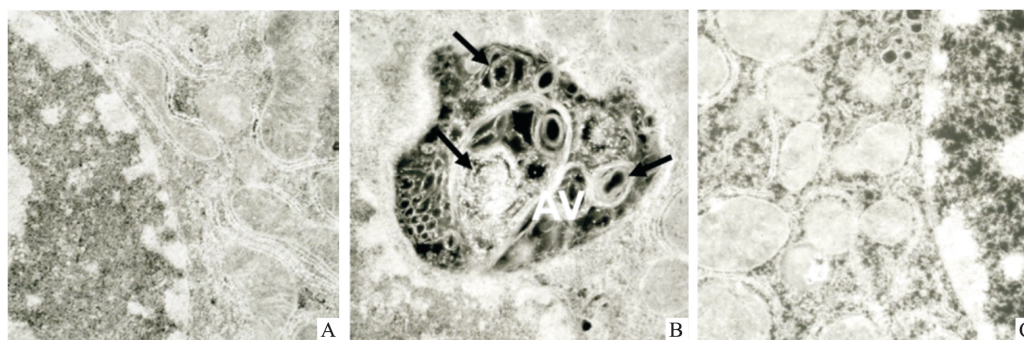


图 1 透射电镜观察各组肝细胞中细胞器及自噬溶酶体形态 ×15 000

A:S 组;B:HIR 组;C:PHIR 组

意义。见图2。

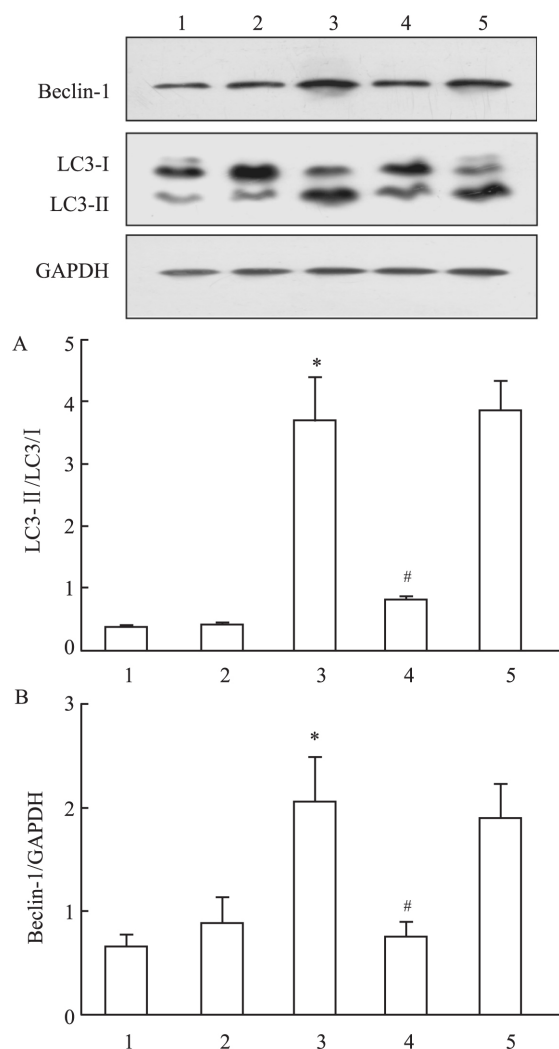


图2 Western blot法检测

5组大鼠肝组织LC3-II、LC3-I、Beclin-1表达

A: LC3-II/LC3-I; B: Beclin-1/GAPDH; 1: S组; 2: P组; 3: HIR组; 4: PHIR组; 5: IHIR组; 与S组比较: * $P < 0.05$; 与HIR组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

肝移植术、肝脏部分切除手术等都可能导致肝脏缺血再灌注损伤,增加肝癌手术治疗或肝移植的难度和风险。本研究参考文献^[5]报道方法通过阻断肝左、中叶的血供造成肝脏70%缺血,对大鼠血流动力学和实验结果影响小。结果表明,与S组比较,HIR组大鼠血清ALT、AST活力显著上升,提示大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型制备成功。

自噬是细胞内自我防御机制,缺血期细胞内形成自噬体包裹受损细胞器,如线粒体、内质网、复合高尔基体及异常细胞成分脂类、糖原等,并与溶酶体

融合为自噬溶酶体降解所包裹物质,以此来维持内环境的稳定^[6]。但是超过细胞承受范围的刺激,导致细胞自噬水平过高则会引发自噬参与的细胞死亡^[7]。目前已经鉴定出多种参与自噬的自噬相关基因(Autophagy associated gene, Atg),在哺乳动物中,Atg8被统称为LC3,Atg6被称为Beclin-1。LC3前体形成后,首先加工成LC3-I,暴露出其甘氨酸残基,被泛素样酶Atg7活化后,转运至Atg3,修饰后成膜结合形式LC3-II。LC3-II定位于前自噬体和自噬体膜表面,是自噬体膜的特异性标志物,因此LC3-II/LC3-I含量反映细胞自噬活动的强弱^[8]。而Beclin-1作为Atg6同源物,在再灌注时激发的自噬会引起自噬小体的清除受损继而导致肝细胞死亡^[9]。一方面,组成Beclin-1-PI3KC3复合体,利于自噬体的形成。另一方面,抗紫外线相关基因的产物蛋白可以直接和Beclin-1结合,形成Beclin-1-PI3KC3-UVRAG复合体,促进自噬体的成熟^[10]。本研究采用经典的Western blot法检测LC3-II、LC3-I、Beclin-1蛋白的表达水平,保证了数据的客观性与准确性。

本研究结果通过在体实验表明,透射电镜下HIR组肝细胞内富含大量自噬体及自噬溶酶体,且肝功能明显下降,而与HIR组相比,PHIR组肝细胞内线粒体、内质网等结构完整,肝功能明显改善,提示异丙酚可以明显抑制自噬体形成,减少自噬溶酶体,减弱肝细胞损伤。本研究显示:与S组相比,P组LC3-II/LC3-I比值和Beclin-1的蛋白表达水平无明显改变,提示异丙酚本身不增加自噬水平;而与HIR组比较,PHIR组肝细胞LC3-II/LC3-I比值和Beclin-1的蛋白表达水平均显著下降,提示异丙酚可能通过抑制LC3-I转化为LC3-II,抑制Beclin-1合成,从而抑制自噬体的形成和成熟,减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤;同时与HIR组相比,IHIR组LC3-II/LC3-I含量和Beclin-1的表达水平则无明显变化,提示异丙酚抑制自噬的作用与其溶媒脂肪乳无关。

综上所述,异丙酚减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤可能与其抑制LC3-I转化为LC3-II,抑制Beclin-1合成,从而抑制自噬体的形成和成熟有关。

参考文献

- [1] Zhao G, Ma H, Shen X, et al. Role of glycogen synthase kinase 3 β in protective effect of propofol against hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2013, 185(1): 388-98.

- [2] Sun K, Xie X, Liu Y, et al. Autophagy lessens ischemia liver injury by reducing oxidative damage [J]. *Cell Bioscience*, 2013, 3(1): 26.
- [3] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3): 377–88.
- [4] 马秀雅, 沈玉君, 李元海, 等. 异丙酚对人肝细胞氧糖剥夺-复氧复糖时自噬的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(6): 725–7.
- [5] Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Jiménez-Castro M B, et al. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:298657.
- [6] Rautou P E, Mansouri A, Lebre D, et al. Autophagy in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(6): 1123–34.
- [7] Lee S C, Kim K H, Kim O H, et al. Activation of autophagy by everolimus confers hepatoprotection against ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(7): 2042–54.
- [8] Jiang P, Mizushima N. LC3-and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells [J]. *Methods*, 2015, 75: 13–8.
- [9] Ma X, Liu H, Foyil S R, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2012, 125(25): 3170–81.
- [10] 徐玉彬, 张培建, 刘 谦, 等. 自噬相关蛋白 Beclin 1 在肝脏缺血再灌注损伤模型中的作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016(2): 209–14.

Effect of propofol preconditioning on autophagy during hepatic ischemia reperfusion injury in rats

Tang Weixiang¹, Shen Yujun², Li Yuanhai¹, et al

(¹Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

² Institute of Biopharmaceutical Research, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To evaluate the effect of propofol on autophagy during hepatic ischemia reperfusion in rats.

Methods Fifty adult male Sprague-Dawley (SD) rats, weighing 240 ~ 280 g, were randomly divided into 5 groups ($n = 10$ each): sham operation group (group S); propofol alone group (group P); hepatic ischemia reperfusion (HIR) injury group (group HIR); propofol pretreatment group (group PHIR); intralipid pretreatment group (group IHIR). Propofol was infused at a rate of 12 mg/(kg · h) for 45 min in group P. HIR was induced by inflow occlusion to median and left liver lobes (approximately 70%) for 1 h of ischemia followed by 6 h reperfusion in male SD rats. Propofol was infused at a rate of 12 mg/(kg · h) 30 min before ischemia until 15 min of ischemia in group PHIR. Each group observed indicators: serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST); the expression of autophagy-related proteins such as microtubule associated protein light chain 3-I (LC3-I), microtubule associated protein light chain 3-II (LC3-II) and Beclin-1 was evaluated by Western blot. **Results** The electron microscopy showed that the structure of the hepatic cells was normal in group S, there were a lot of autophagosomes and autolysosomes in the hepatic cells in group HIR, and structure of the hepatic cells was normal in group PHIR. Compare with group S, the serum ALT and AST activity was significantly increased, the expression of LC3-II / LC3-I and Beclin-1 was significantly up-regulated in group HIR ($P < 0.05$), and no significant change was found in group P. Compared with group HIR, the ALT and AST activity was significantly decreased in serum, the expression of LC3-II / LC3-I and Beclin-1 was significantly down-regulated in group PHIR ($P < 0.05$). No significant change was found in group IHIR. **Conclusion** Hepatic ischemia reperfusion injury could be alleviated by propofol preconditioning through suppression of autophagy in rats.

Key words propofol; liver; ischemia reperfusion injury; autophagy