doi:10.11659/jjssx.11E024069

·基础研究·

丙泊酚对脓毒症大鼠急性肾损伤的保护作用及机制

余 沛,张濒丹 (陆军军医大学大坪医院麻醉科,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 探究丙泊酚对脓毒症大鼠急性肾损伤的保护作用及潜在机制。**方法** 84只成年SD大鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组。假手术组仅开关腹,模型组行盲肠结扎穿孔术建模。治疗组于建模前30 min腹腔注射丙泊酚(60 mg/kg),建模后6 h再次腹腔注射相同剂量丙泊酚。观察各组大鼠肾功能和肾病理改变,记录各组大鼠24 h内存活情况,并计算24 h存活率。通过脂多糖(LPS)刺激人肾小管上皮细胞系建立体外脓毒症模型,观察肾小管上皮细胞凋亡及氧化应激的变化;分析丙泊酚对LPS刺激后的肾小管上皮细胞氧化应激及凋亡的影响。**结果** 脓毒症大鼠出现肾功能下降和肾组织结构破坏,大鼠24 h存活率显著下降,生存时间缩短。丙泊酚可有效改善脓毒症大鼠肾功能,降低肾Paller评分,提高大鼠存活率,延长大鼠生存时间。LPS可导致肾小管上皮细胞凋亡和细胞氧化应激,而丙泊酚可抑制肾小管上皮细胞氧化应激和细胞凋亡。**结论** 丙泊酚可有效减轻脓毒症大鼠急性肾损伤,其机制与抑制肾小管上皮细胞凋亡和氧化应激有关。

[关键词] 丙泊酚;脓毒症;大鼠;急性肾损伤;细胞凋亡;氧化应激
[中图分类号] R692 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-11-13

Protective effect and mechanism of propofol on acute kidney injury in septic rats

YU Pei, ZHANG Bin-dan (Department of Anesthesiology, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the protective effect and potential mechanism of propofol on acute kidney injury in septic rats. **Methods** A total of 84 adult SD rats were randomly divided into the sham surgery group, the model group and the treatment group. The sham surgery group only opened and closed the abdomen, while the model group underwent cecal ligation and perforation for modeling. In the treatment group, propofol (60 mg/kg) was intraperitoneally injected 30 minutes before modeling, and the same dose of propofol was intraperitoneally injected again 6 hours after modeling. The renal function and pathological changes of rats in each group were observed, 24-hour survival status of rats in each group were recorded, and the 24-hour survival rate was calculated. A sepsis model was established in vitro by stimulating human renal tubular epithelial cell line with lipopolysaccharide (LPS), and the changes of apoptosis and oxidative stress of renal tubular epithelial cells were observed. The effects of propofol on oxidative stress and apoptosis of renal tubular epithelial cells stimulated by LPS were analyzed. **Results** The renal function of sepsis rats was decreased, the renal tissue structure was damaged, the 24-hour survival rate of rats was decreased significantly and the survival time was shortened. Propofol could effectively improve renal function, reduce renal Paller score, increase survival rate and prolong survival time in sepsis rats. LPS could induce apoptosis and oxidative stress of renal tubular epithelial cells, while propofol could inhibit oxidative stress and apoptosis of renal tubular epithelial cells. **Conclusion** Propofol can effectively alleviate acute kidney injury in septic rats, and its mechanism is related to the inhibition of apoptosis and oxidative stress of renal tubular epithelial cells.

Keywords: propofol; sepsis; rats; acute kidney injury; cell apoptosis; oxidative stress

脓毒症是一种由感染引发的严重全身性炎症反应,常导致多器官功能障碍综合征。其中,急性肾损伤是脓毒症最常见的并发症之一,其发生率为40%~60%,患者的病死率也显著增加[1]。脓毒症导致的急性肾损伤发病机制复杂,涉及炎症反应、血流动力学改变、氧化应激及免疫失调等[2]。目前,临床上对脓毒症急性肾损伤的治疗主要依赖于抗生素治疗、液体复苏以及血流动力学支持。然而,这些措施尚未能有效降低该病的病死率。即使广泛使用肾替代治疗,效果也欠佳[3]。因此,迫切需要进一步探索脓毒症急性肾损伤的病理生理机制,从而开发出更具针对性的治疗策略。

丙泊酚是一种广泛使用于临床麻醉及镇静的短效静脉注射麻醉药物,近年来因其潜在的器官保护作用引起了广泛关注[4-5]。丙泊酚通过增强$GABA_A$受体功能和阻断钠、钙离子通道等多种机制,表现出抗炎、抗氧化及改善微循环等多种生物学效应[6-7]。研究表明,丙泊酚能够在脓毒症相关的多器官损伤模型中发

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82300561);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0713)

[通信作者] 张濒丹,E-mail:zhangbindan9705@163.com

挥器官保护作用,包括心、肝、肺和肾等[8-10]。具体而言,丙泊酚在脓毒症条件下能显著减少炎症因子的释放和细胞因子的表达,从而减轻组织损伤,改善器官功能。因此,丙泊酚有望成为脓毒症急性肾损伤治疗的新思路之一。因此,本研究通过构建脓毒症动物与细胞模型,观察丙泊酚对脓毒症急性肾损伤的保护作用,并探讨其机制,以期为脓毒症的临床治疗指明新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物

84只成年SPF级SD大鼠,体质量(200±20)g,雌雄各半,由陆军军医大学大坪医院实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(渝)2022-0003。实验前禁食12 h,禁饮4 h。相关动物实验已通过陆军军医大学大坪医院伦理委员会批准(批准号:AMUWEC20224867)。

1.2 主要试剂

人肾小管上皮细胞系HK-2细胞购自上海中国科学院细胞库,丙泊酚购自江苏恩华药业股份有限公司,CCK-8试剂盒购自美国MedChemExpress公司,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)购自美国Sigma公司,Anti-β-actin抗体购自美国CST公司,Anti-BAX抗体、Anti-Bcl-xl抗体及山羊抗兔二抗购自美国Abcam公司,活性氧(reactive oxygen species,ROS)染料和丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 分组设计及处理

84只SD大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组和治疗组,每组28只。假手术组仅切开后关腹;模型组采用盲肠结扎穿孔术构建脓毒症大鼠模型[11],12 h后观察大鼠平均动脉压,当平均动脉压下降30%以上视为建模成功;治疗组于建模前30 min腹腔注射丙泊酚(60 mg/kg),建模后6 h再次腹腔注射丙泊酚(60 mg/kg)。建模后12 h,各组分别取4只大鼠肾组织及8只大鼠动脉血用于后续实验;建模后24 h,观察各组剩余16只大鼠存活情况。

1.4 脓毒症大鼠存活观察

建模后12 h肌肉注射青霉素、链霉素,然后将大鼠放回笼内饲养,正常饮食饮水,每30 min观察1次,共观察24 h,记录大鼠的生存时间,使用*Kaplan-Meier*曲线分析大鼠存活率。

1.5 脓毒症大鼠肾功能检测

建模成功后,抽取大鼠动脉血2 mL,利用全自动生化分析仪测定肌酐和尿素氮水平。

1.6 大鼠肾组织HE染色

取大鼠肾组织置于4%多聚甲醛固定,48 h后脱水、石蜡包埋、切片、HE染色,显微镜下观察肾组织病理结构改变。采用Paller评分[12]评估肾小管损伤程度,即在高倍镜下取10个高清镜视野,每个视野观察10个肾小管:肾小管明显扩张、细胞扁平(1分);肾小管内出现管型(2分);肾小管管腔内有坏死、脱落细胞,但未成管型或细胞碎片(1分);上皮细胞颗粒变性(1分)、空泡变性(1分)、细胞核固缩(1分)。总分越高,肾损伤越严重。

1.7 细胞ROS水平检测

HK-2细胞培养于共聚焦皿中,待细胞生长至80%~95%融合时,给予LPS(1 μg/mL)处理12 h建立脓毒症细胞模型(LPS组),Pro组给予100 μmol/L丙泊酚30 min后再给予相同剂量LPS处理12 h,正常对照组(CTL组)仅更换为无血清培养基培养12 h。弃培养基,PBS清洗3次,用无血清培养基配制ROS染料(10 μmol/L),37 ℃孵育30 min后,更换为无血清培养基,并于共聚焦显微镜下观察。

1.8 细胞MDA检测

将HK-2细胞培养于培养瓶中,建模成功后,裂解各组细胞,以11 304 r/min的速度离心10 min后收集上清,按照MDA试剂盒说明书步骤进行检测。

1.9 CCK-8测定细胞活力

96孔板中接种100 μL HK-2细胞悬液,建模成功后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,37 ℃孵育2 h,随后用酶标仪检测450 nm波长处吸光度值。

1.10 蛋白表达检测

提取HK-2细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。经SDS-PAGE电泳2 h,转移至PVDF膜上后,用5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h,清洗后将膜与一抗BAX、Bcl-xl(稀释比均为1∶1 000)于4 ℃孵育过夜,次日洗膜后与二抗(1∶20 000)室温孵育1 h,洗涤后显影。

1.11 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行数据分析。实验数据均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间差异比较方差齐采用单因素方差分析,两两比较用*LSD*法,方差不齐采用*Tamhane's*法处理。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙泊酚对脓毒症大鼠生存的影响

本研究发现大部分大鼠在24 h内死亡,因此统计

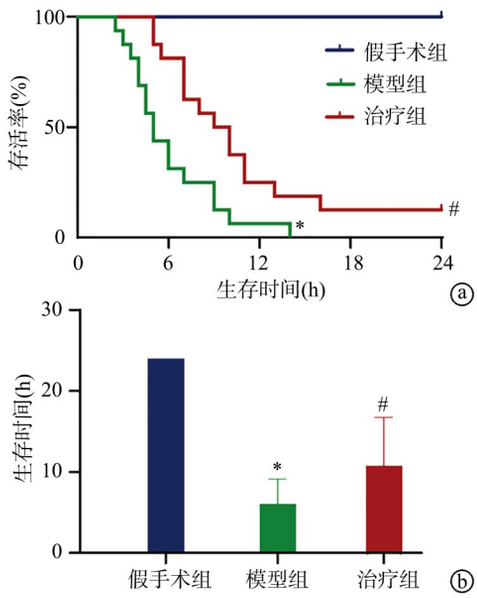
了24 h内大鼠生存时间和存活率。假手术组大鼠生存时间为24 h,12 h及24 h存活率均为100%;模型组大鼠的生存时间为(6.1±3.1)h,中位生存时间为5 h,12 h存活率为6.3%,24 h存活率为0;治疗组大鼠的生存时间为(10.8±5.9)h,中位生存时间为9.5 h,12 h存活率为25.0%,24 h存活率为12.5%。与假手术组大鼠相比,模型组大鼠的生存时间和存活率均显著缩短/下降(P<0.05);与模型组相比,治疗组大鼠生存时间和存活率均明显延长/增加(P<0.05),见图1。

2.2　丙泊酚对脓毒症大鼠急性肾损伤的影响

假手术组肾结构完整,无出血或炎症浸润;模型组肾小管管腔内有坏死、脱落细胞,肾小管上皮细胞出现空泡变性,间质明显水肿,肾小管管腔变窄;治疗组肾结构较完整,病理改变明显减轻(图2a)。与假手术组比较,模型组Paller评分明显增高(P<0.05);与模型组比较,治疗组Paller评分明显下降(P<0.05),见图2b。与假手术组比较,模型组肾损伤标志物尿素氮和肌酐水平明显增加(P<0.05);与模型组相比,治疗组尿素氮和肌酐水平明显下降(P<0.05),见图2c、d。

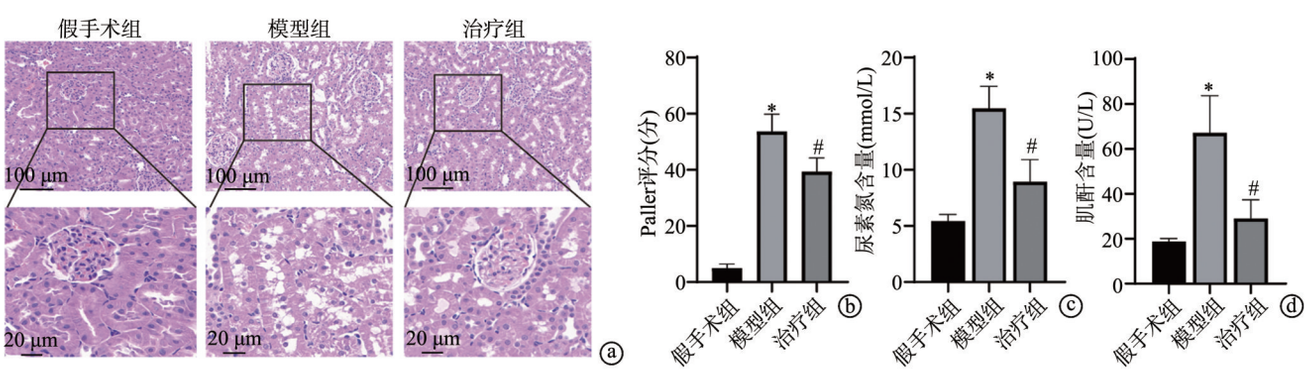
2.3　丙泊酚可抑制肾小管上皮细胞凋亡

与CTL组相比,LPS组细胞活力显著降低(P<0.05),促凋亡蛋白BAX表达水平显著增加(P<0.05),抑凋亡蛋白Bcl-xl表达水平降低(P<0.05);与LPS组相比,Pro组细胞活力显著增加(P<0.05),BAX蛋白表达水平降低(P<0.05),Bcl-xl蛋白表达水平增加(P<0.05),见图3。



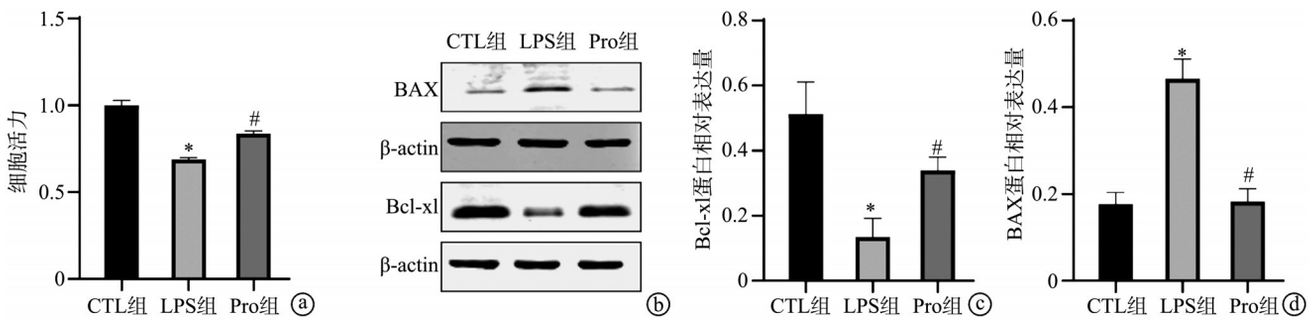
a:*Kaplan-Meier*曲线分析24 h内大鼠存活率;b:大鼠生存时间　*:与假手术组比较,P<0.05;#:与模型组比较,P<0.05

图1　丙泊酚对脓毒症大鼠生存的影响



a:肾组织HE染色;b:Paller评分;c:尿素氮检测结果;d:肌酐检测结果　*:与假手术组比较,P<0.05;#:与模型组比较,P<0.05

图2　丙泊酚对脓毒症大鼠急性肾损伤的影响



a:CCK-8检测细胞活力;b:Western blot检测细胞中BAX、Bcl-xl蛋白表达;c、d:Bcl-xl、BAX蛋白表达定量统计　*:与CTL组比较,P<0.05;#:与LPS组比较,P<0.05

图3　丙泊酚对肾小管上皮细胞凋亡的影响

2.4 丙泊酚可抑制肾小管上皮细胞氧化应激

与CTL组相比，LPS组细胞ROS、MDA水平增加（$P<0.05$），Pro组细胞ROS、MDA水平显著下降（$P<0.05$），见图4。

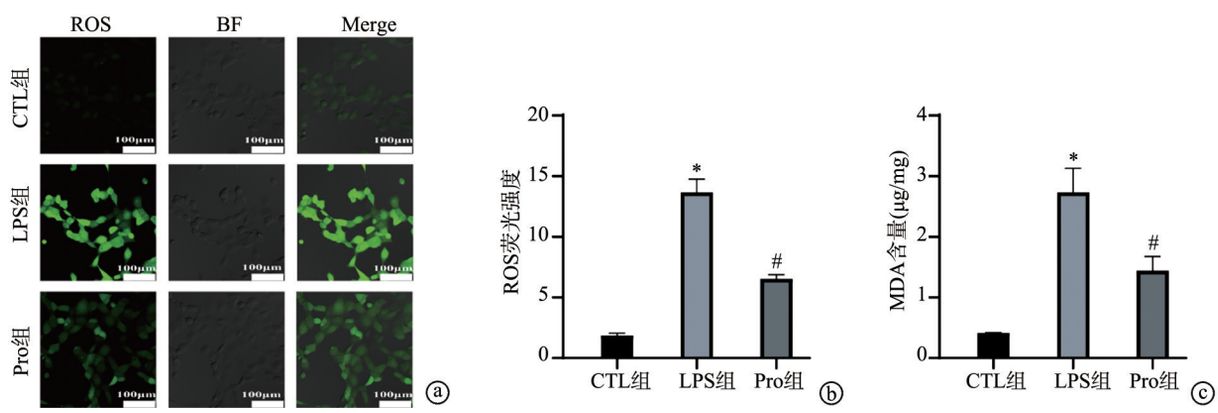
3 讨论

脓毒症急性肾损伤是临床常见危重并发症，会显著增加患者病死率并影响远期预后。近年来研究表明，细胞凋亡在脓毒症急性肾损伤的病理机制中占据核心地位[13-14]。在脓毒症状态下，内毒素及大量炎症因子（如TNF-α、IL-1β等）的释放可激活多条凋亡相关信号通路，包括caspase依赖的凋亡通路、Fas/FasL系统以及线粒体途径，最终导致肾小管上皮细胞广泛凋亡，肾功能急剧恶化[15-17]。本研究发现，脓毒症可引起肾小管上皮细胞凋亡，导致促凋亡相关蛋白BAX显著上调，而抗凋亡蛋白Bcl-xl显著下调。细胞凋亡不仅可直接引起肾单位损失，还可通过介导炎症放大效应形成恶性循环，进一步加重肾损伤[18]。因此，针对细胞凋亡的干预策略已成为脓毒症急性肾损伤治疗的重要方向。

本研究还发现，脓毒症可导致肾小管上皮细胞发生显著的氧化应激，表现为ROS生成增加和脂质过氧化标志物MDA水平升高。氧化应激是脓毒症病理过程中的另一关键环节。机体在感染应激下ROS生成大幅增加，抗氧化系统的清除能力不足，导致脂质、蛋白质和DNA氧化损伤，进而诱发细胞凋亡与坏死[19-20]。尤其在肾这类高灌注器官中，氧化应激可激活多种损伤相关分子模式，并通过NF-κB、Nrf2、p38 MAPK等信号通路加剧炎症反应和细胞程序性死亡[21]。值得注意的是，氧化应激与细胞凋亡密切相关，ROS可上调促凋亡基因表达并诱导线粒体功能障碍，形成自我放大的损伤循环，这在脓毒症多器官损伤的发生发展中尤为突出[22-23]。

丙泊酚作为一种广泛使用的静脉麻醉药物，除镇静作用外，还具有显著的抗氧化和抗凋亡特性。研究提示，丙泊酚可能通过调节Bcl-2/BAX、抑制caspase-3活化以及调控PI3K/Akt等信号通路发挥抗凋亡作用[24]。本研究结果显示，丙泊酚可明显提高细胞活力，促进Bcl-xl蛋白表达，抑制BAX蛋白表达，从而减少肾小管上皮细胞凋亡。研究表明，丙泊酚能够清除体内多余的ROS，减少氧化应激造成的细胞损伤[25]。此外，丙泊酚的苯酚结构可直接清除氧自由基，增强超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性，从而改善氧化应激状态[26]。本研究亦发现，丙泊酚给药后，细胞ROS、MDA水平显著降低，表明其可缓解氧化应激。基于上述研究结果，我们推测，丙泊酚可能通过其苯酚结构清除氧自由基，抑制ROS生成，还可直接激活超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶，两条途径协同作用，减少对肾小管上皮细胞的氧化应激损伤，进而抑制凋亡通路激活，实现对脓毒症急性肾损伤的保护效应，为其在脓毒症辅助治疗中的潜在应用提供了理论依据。

综上，本研究发现，脓毒症大鼠可发生急性肾损伤，具体表现为肾功能显著下降，肾组织结构严重破坏，同时存活率明显降低，生存时间缩短。而丙泊酚干预可有效减轻脓毒症大鼠的肾损伤，改善肾功能，并显著提高大鼠存活率，延长生存时间。进一步的机制研究表明，脓毒症可导致肾小管上皮细胞凋亡增加和氧化应激水平升高，而丙泊酚能够有效抑制上述反应，提示其可能通过抗氧化和抗凋亡途径发挥肾保护作用。但本研究仍存在一定局限性。首先，结论基于动物和细胞模型获得，其临床适用性需通过进一步临



a：激光共聚焦显微镜下HK-2细胞ROS荧光强度；b：ROS荧光强度定量统计；c：MDA含量 *：与CTL组比较，$P<0.05$；#：与LPS组比较，$P<0.05$

图4 丙泊酚对肾小管上皮细胞氧化应激的影响

床研究验证。其次,丙泊酚的具体分子机制、如何精准调控抗氧化通路及其在不同剂量和时间窗下的效应差异,尚未深入探讨。未来研究可结合基因敲除动物模型、特异性抑制剂等多种技术手段,系统阐明丙泊酚在脓毒症急性肾损伤中的机制,为其转化至临床应用提供可靠依据。

[参考文献]

[1] Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury[J]. BMJ, 2019,364:k4891. doi:10.1136/bmj.k4891.

[2] Kuwabara S, Goggins E, Okusa MD. The pathophysiology of sepsis-associated AKI[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2022, 17(7): 1050-1069. doi:10.2215/CJN.00850122.

[3] White KC, Serpa-Neto A, Hurford R, et al. Sepsis-associated acute kidney injury in the intensive care unit:incidence,patient characteristics, timing, trajectory, treatment, and associated outcomes. A multicenter, observational study[J]. Intensive Care Med, 2023, 49(9): 1079-1089. doi:10.1007/s00134-023-07138-0.

[4] Han RH, Huang HM, Han H, et al. Propofol postconditioning ameliorates hypoxia/reoxygenation induced H9c2 cell apoptosis and autophagy via upregulating forkhead transcription factors under hyperglycemia [J]. Mil Med Res, 2021, 8 (1): 58. doi: 10.1186/s40779-021-00353-0.

[5] Tang Y, Gao X, Xu J, et al. Remimazolam besylate versus propofol for deep sedation in critically ill patients:a randomized pilot study[J]. Crit Care, 2023, 27(1):474. doi:10.1186/s13054-023-04760-8.

[6] Fan X, Gong M, Yu H, et al. Propofol enhances stem-like properties of glioma via $GABA_AR$-dependent Src modulation of ZDHHC5-EZH2 palmitoylation mechanism[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1):398. doi:10.1186/s13287-022-03087-5.

[7] Vellinga R, Hannivoort LN, Introna M, et al. Prospective clinical validation of the Eleveld propofol pharmacokinetic-pharmacodynamic model in general anaesthesia[J]. Br J Anaesth, 2021, 126(2): 386-394. doi:10.1016/j.bja.2020.10.027.

[8] Zhou BW, Zhang WJ, Zhang FL, et al. Propofol improves survival in a murine model of sepsis via inhibiting Rab5a-mediated intracellular trafficking of TLR4[J]. J Transl Med, 2024, 22(1):316. doi:10.1186/s12967-024-05107-9.

[9] Xie L, Zhao M, Zong L, et al. Propofol ameliorates sepsis-induced myocardial dysfunction via anti-apoptotic, anti-oxidative properties, and mTOR signaling[J]. Discov Med, 2024, 36(189): 2088-2097. doi:10.24976/Discov.Med.202436189.193.

[10] Bredthauer A, Geiger A, Gruber M, et al. Propofol ameliorates exaggerated human neutrophil activation in a LPS sepsis model[J]. J Inflamm Res, 2021, 14:3849-3862. doi:10.2147/JIR.S314192.

[11] Tan L, She H, Zheng J, et al. Effects of Malate Ringer's solution on myocardial injury in sepsis and enforcement effects of TPP@PAMAM-MR [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 591. doi: 10.1186/s12967-022-03811-y.

[12] Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat[J]. J Clin Invest, 1984, 74(4): 1156-1164. doi:10.1172/JCI111524.

[13] Tsuji N, Tsuji T, Yamashita T, et al. BAM15 treats mouse sepsis and kidney injury, linking mortality, mitochondrial DNA, tubule damage, and neutrophils[J]. J Clin Invest, 2023, 133(7): e152401. doi: 10.1172/JCI152401.

[14] Lin Q, Li S, Jiang N, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy [J]. Autophagy, 2021, 17(10): 2975-2990. doi: 10.1080/15548627.2020.1848971.

[15] Wang Y, Xi W, Zhang X, et al. CTSB promotes sepsis-induced acute kidney injury through activating mitochondrial apoptosis pathway[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1053754. doi: 10.3389/fimmu.2022.1053754.

[16] Uchida T, Yamada M, Inoue D, et al. Involvement of innate immune system in the pathogenesis of sepsis-associated acute kidney injury [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(15): 12465. doi: 10.3390/ijms241512465.

[17] Wang L, Gao X, Tang X, et al. SENP1 protects cisplatin-induced AKI by attenuating apoptosis through regulation of HIF-1α[J]. Exp Cell Res, 2022, 419(1):113281. doi:10.1016/j.yexcr.2022.113281.

[18] Huang G, Bao J, Shao X, et al. Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis[J]. Life Sci, 2020, 254: 117791. doi:10.1016/j.lfs.2020.117791.

[19] Zhang Q, Shen X, Yuan X, et al. Lipopolysaccharide binding protein resists hepatic oxidative stress by regulating lipid droplet homeostasis [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 3213. doi: 10.1038/s41467-024-47553-5.

[20] Li J, Wang L, Wang B, et al. NOX4 is a potential therapeutic target in septic acute kidney injury by inhibiting mitochondrial dysfunction and inflammation [J]. Theranostics, 2023, 13 (9): 2863-2878. doi: 10.7150/thno.81240.

[21] Su L, Zhang J, Gomez H, et al. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury [J]. Autophagy, 2023, 19(2): 401-414. doi: 10.1080/15548627.2022.2084862.

[22] Yu H, Jin F, Liu D, et al. ROS-responsive nano-drug delivery system combining mitochondria-targeting ceria nanoparticles with atorvastatin for acute kidney injury[J]. Theranostics, 2020, 10(5): 2342-2357. doi:10.7150/thno.40395.

[23] Cantoni O, Zito E, Fiorani M, et al. Arsenite impinges on endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk to elicit mitochondrial ROS formation and downstream toxicity[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 76: 132-138. doi:10.1016/j.semcancer.2021.06.002.

[24] Sun P, Huang H, Ma J, et al. Repurposing propofol for breast cancer therapy through promoting apoptosis and arresting cell cycle [J]. Oncol Rep, 2024, 52(5):155. doi:10.3892/or.2024.8814.

[25] Xuan W, Lu X, Yang Z, et al. Propofol protects against erastin-induced ferroptosis in HT-22 cells[J]. J Mol Neurosci, 2022, 72(9): 1797-1808. doi:10.1007/s12031-022-02017-7.

[26] Zeng W, Xing Z, Tan M, et al. Propofol regulates activated macrophages metabolism through inhibition of ROS-mediated GLUT1 expression[J]. Inflamm Res, 2021, 70(4): 473-481. doi: 10.1007/s00011-021-01449-y.

(编辑:贺绍梅)