论著

文章编号:1000-5404(2007)20-1976-03

瑞芬太尼对肝细胞缺氧复氧损伤保护作用的机制研究

魏 勇,顾健腾,鲁开智,陶国才 (第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨瑞芬太尼对缺氧复氧的人肝细胞损伤的作用及其可能的作用机制。**方法** 将培养的人肝细胞分为5组,分别为正常对照(C)组、单纯缺氧复氧损伤(AR)组、瑞芬太尼(R)组、白屈菜红碱(CH)组和混合(R+CH)组,$n=6$。C组正常培养,其余各组缺氧培养15 h,复氧5 h,然后收集细胞,进行:①肝细胞线粒体的丙二醛(MDA)含量测定;②用Annexin V/PI染色,于流式细胞仪下计数凋亡细胞的百分数;③提取RNA,以PKC mRNA为目的基因,进行RT-PCR,然后电泳,对条带的吸光值进行比较。**结果** AR组的MDA含量明显高于C组,R组和CH组的MDA含量介于AR与C组之间($P<0.05$)。AR组的肝细胞凋亡率明显高于C组,R组和CH组的肝细胞凋亡率介于AR与C组之间($P<0.05$)。AR组的PKC mRNA转录量明显高于C组,R组和CH组的PKC mRNA转录量介于AR与C组之间($P<0.05$),R+CH组的PKC mRNA转录量低于C组($P<0.05$)。**结论** 瑞芬太尼对缺氧复氧的肝细胞具有保护作用,且可能与其抑制PKC mRNA的转录有关。

关键词: 瑞芬太尼;肝细胞;缺氧;复氧;蛋白激酶C
中图法分类号: R322.47;R364.4;R791.1 **文献标识码**: A

Remifentanyl protects hepatocytes against anoxia-reoxygenation injury

WEI Yong, GU Jian-teng, LU Kai-zhi, TAO Guo-cai (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To assess the protective effect of remifentanil on cultured human hepatocytes against anoxia-reoxygenation injury. **Methods** Cultured hepatocytes were divided into 5 groups: group C receiving normoxia as control; groups AR, R, CH, R+CH receiving 15-hour xypoxia followed by 5-hour reoxygenation (group R receiving 5 ng/ml remifentanil, group CH 10 μmol/L chelerythrine, group R+CH 5 ng/ml remifentanil and 10 μmol/L chelerythrine before reoxygenation). The content of MDA in the hepatocyte mitochondria were measured. The rate of apoptotic cells was measured by flow cytometry. The expression of protein kinase C mRNA was measured by RT-PCR. **Results** Anoxia-reoxygenation caused dramatic increase in the content of MDA, the rate of apoptotic cells and the expression of protein kinase C mRNA. The three indexes mentioned above of groups R and CH were between that of groups C and AR ($P<0.05$). The expression of protein kinase C mRNA in group R+CH was less than that in group C ($P<0.05$). **Conclusion** Remifentanil can protect cultured hepatocytes against anoxia-reoxygenation injury, and its mechanism may be associated with protein kinase C mRNA.

Key words: remifetanil; hepatocytes; anoxia; reoxygenation; protein kinase C

作为细胞信号传导重要成分的蛋白激酶C(PKC)在细胞的凋亡中起着重要作用。研究证实[1],细胞凋亡是导致肝脏缺血再灌注损伤的重要机制之一,而且是肝功能衰竭的重要原因。目前,大量对阿片类镇痛药保护机制的研究来自于心脏和脑的结果,已经证实蛋白激酶C(PKC)参与了保护作用,而瑞芬太尼(remifentanil)对肝脏缺血再灌注损伤的作用研究不多,且机制尚不清楚。本研究旨在通过对培养肝细胞缺氧复氧模拟肝脏的缺血再灌注过程,并讨论瑞芬太尼对培养肝细胞缺氧复氧损伤的保护作用及其可能的作用机制,为瑞芬太尼的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人肝细胞的复苏和培养

人正常肝细胞株HL-7702购于中国科学院上海生命科学

作者简介:魏 勇(1974-),男,湖北省宜都市人,硕士研究生,主治医师,主要从事全麻药对肝脏影响方面的研究。电话:(023)65399091,E-mail: weiyong_1219@163.com
通讯作者:陶国才,电话:(023)68754197
收稿日期:2007-07-05;修回日期:2007-09-15

研究所。将冻存的细胞株于 37 ℃迅速复温,2 000 × g 离心 5 min,弃上清,加含 10% 胎牛血清(杭州四季清)的高糖 DMEM 培养基(Gibco)混悬,按 5×10^5/ml 的密度接种于培养瓶中,放入 37 ℃、5% CO_2、95% 空气、90% 湿度的培养箱。每 48 小时更换一次培养基。

1.2　细胞分组

将细胞分为 5 组,每组 6 瓶,细胞数约为 5×10^6/瓶。①C:正常对照组,正常培养基,培养条件不变。②AR:损伤组。③R:瑞芬太尼组,瑞芬浓度为 5 ng/ml。④CH:白屈菜红碱组,白屈菜红碱终浓度为 10 μmol/L。⑤R + CH:瑞芬太尼 + 白屈菜红碱组,瑞芬浓度为 5 ng/ml,白屈菜红碱终浓度为 10 μmol/L。

1.3　肝细胞缺氧复氧模型的建立

参照何英[2]和高毅[3]的研究方法,C 组采用正常培养基,常氧培养。其它各组用 KHH 液(Krebs-Henseleit-HEPES 液)置换含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 液,于低氧培养箱(2% O_2、8% CO_2、90% N_2、37 ℃)培养 15 h;然后更换为正常培养基,按分组加入各种药物37 ℃、5% CO_2、95% 空气、90% 湿度培养5 h。

1.4　细胞凋亡的检测

将培养好的细胞用 0.25% 胰酶消化 5 min,加入培养基终止消化,细胞悬液移入离心管,1 500 × g 离心 5 min,弃上清,PBS 清洗 2 次(离心 2 000 × g,5 min),收集 1×10^6 细胞,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基)说明操作,对细胞进行染色。用流式细胞仪检测(Ex = 488 nm,Em = 530 nm)细胞凋亡情况。

1.5　细胞线粒体 MDA 含量测定

将处理好的细胞用 0.25% 胰酶消化 3 min,加入培养基终止消化,细胞悬液移入离心管,1 500 × g 离心 5 min,弃上清,沉淀加入细胞裂解液处理,以 17 000 × g 离心 20 min,弃上清,留取沉淀物。用 Tris-HCl 缓冲液吹打制成肝线粒体悬液。按 MDA 试剂盒(南京建成)说明操作,测定各样本中的 MDA 含量。

1.6　RT-PCR 检测肝细胞蛋白激酶 C mRNA 的表达

收集各组肝细胞,提取总 RNA,逆转录后行 PCR。PKC-α 及 β-actin 引物参照 Gen-Bank 中 cDNA 序列用 Ptimer Premier5.0 软件设计,PKC-α 引物序列为:5′-AATCTCGGCTCACTGCAACCTC-3′,5′-CGAAGAATCCCTGACACTACGG-3′,扩增出 481 bp 片断。β-actin 引物序列为:5′-GTCCTGTGGCATCCACGAAAC-3′,5′-GCTCCAACCGACTGCTGTCA-3′,扩增出 500 bp 片断。PCR 产物在琼脂糖凝胶中电泳检测,在 UVP 凝胶成像系统下观察并记录结果。使用 bandleader 3.0 凝胶图像处理软件测灰度值,并以目的序列与内参的比值进行统计学分析。

1.7　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　各组肝细胞线粒体的 MDA 含量

损伤组肝细胞线粒体的 MDA 含量明显高于正常对照组($P < 0.05$);瑞芬太尼组、白屈菜红碱组及二者混合组的肝细胞线粒体的 MDA 含量明显高于正常对照组,而低于损伤对照组($P < 0.05$);而混合组的肝细胞线粒体的 MDA 含量又明显低于单独的药物处理组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1　各组细胞 MDA 含量和凋亡率比较

组别	MDA(ng · ml^{-1} · 10^{-5})	凋亡率(%)
C	0.83 ± 0.03	1.28 ± 0.33
AR	2.84 ± 0.04^{a}	33.95 ± 2.18^{a}
R	1.65 ± 0.05^{abc}	20.64 ± 1.88^{abc}
CH	1.65 ± 0.04^{abc}	11.93 ± 1.68^{abc}
R + CH	1.09 ± 0.02^{ab}	26.37 ± 1.15^{ab}

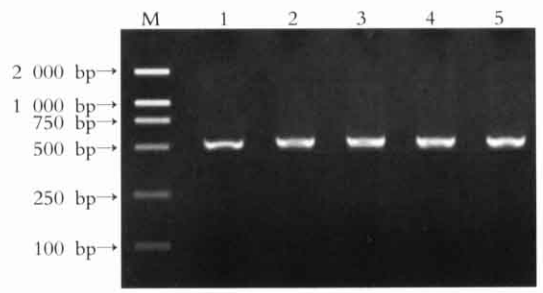
a:$P < 0.05$,与 C 组比较;b:$P < 0.05$,与 AR 组比较;c:$P < 0.05$,与 R + CH 组比较

2.2　各组肝细胞的凋亡率

损伤对照组的肝细胞凋亡率明显高于其它各组($P < 0.05$);R 组、CH 组及二者混合组的肝细胞凋亡率明显高于正常对照组,而低于损伤对照组($P < 0.05$);而混合组的肝细胞凋亡率又明显低于单独的药物处理组($P < 0.05$)。见表 1。

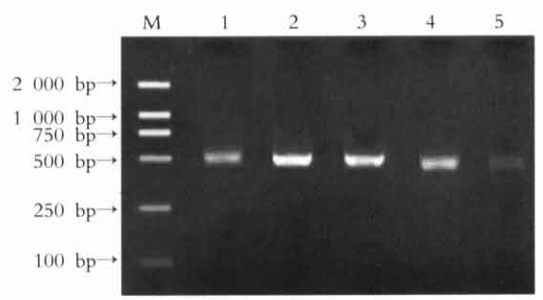
2.3　各组肝细胞蛋白激酶 C(PKC)RT-PCR 产物表达

各组肝细胞蛋白激酶 C RT-PCR 产物的凝胶电泳结果见图 1、2(因内参和目的基因片段长度相近故分别进行电泳)。运用 Band Leader 3.0 凝胶图像处理软件对电泳结果进行分析,将目的条带的灰度值和内参条带的灰度值作比,得出相对灰度值,其值分别为:C 组(0.89 ± 0.08),AR 组(1.23 ± 0.11),R 组(1.02 ± 0.09),CH 组(1.00 ± 0.09),R + CH 组(0.73 ± 0.06)。AR 组的 PKCmRNA 量明显高于其它各组($P < 0.05$),R 和 CH 组的 PKCmRNA 量介于 C 组和 AR 组之间($P < 0.05$),R + CH 组的 PKCmRNA 量低于 C 组($P < 0.05$)。



M:标准;1:C 组;2:AR 组;3:R 组;4:CH 组;5:R + CH 组

图 1　内参条带电泳图



M:标准;1:C 组;2:AR 组;3:R 组;4:CH 组;5:R + CH 组

图 2　各组 PKC RT-PCR 电泳图

3 讨论

临床肝移植过程中，离体肝脏缺血再灌注损伤一直是影响肝移植效果的重要原因。汤礼军等[4]的研究表明，低温保存的供肝组织内没有发现明显的肝实质细胞凋亡，而复温再灌注后的肝实质细胞有明显的凋亡现象。因此，笔者认为促使缺血再灌注的肝细胞发生凋亡的主要过程是在再灌注阶段，故直接将药物的作用时间选在细胞的复氧期，能够有针对性地研究瑞芬太尼对细胞凋亡的影响。

氧化损伤是引起肝细胞凋亡的重要原因。缺血后的肝细胞再灌注时，会产生大量的氧自由基，导致脂质过氧化产物丙二醛(MDA)产量增加，其增加的程度亦能反映细胞氧化损伤的程度。本实验中肝细胞凋亡率越高的组别，其线粒体 MDA 含量也成比例地增加，这也证实了这种观点[5]。

对于 PKC 在细胞凋亡中的作用，王剑明等[6]认为 PKC 能促进胆盐引起的肝细胞凋亡，而使用 CH 后，细胞凋亡率明显下降。Kajstura 发现血管紧张素能引起肌细胞 PKC 的膜易位，胞浆 Ca^{2+} 水平增高，增加肌细胞凋亡，PKC 抑制剂 chelerythrine 能抑制胞浆 Ca^{2+} 的增加和肌细胞凋亡。但亦有证据提示 PKC 的激动剂如佛波脂能抑制凋亡，而其抑制剂 stauroaporine 能引起凋亡。PKC 在不同实验中表现出两种相反的结果，提示 PKC 促进或抑制凋亡，依赖于细胞类型，导致凋亡的因子或条件，细胞周期和细胞内部的信号通道。

白屈菜红碱(CH)是属苯菲啶生物碱，是作用于 PKC 催化区的 PKC 抑制剂。本实验以 CH 作为对照处理，结果显示其对肝细胞的凋亡有抑制作用，而同时细胞 PKC 的 mRNA 转录也受到了抑制，那么笔者推测 CH 通过抑制 PKC 的 mRNA 转录减少了 PKC 的表达，从而通过一系列复杂的信号转导途径抑制了肝细胞的凋亡。

实验结果显示，瑞芬太尼减轻了肝细胞的凋亡，同时也抑制了 PKC 的 mRNA 转录，因此推测瑞芬太尼是作为一种配体激活某种信号转导路径，抑制 PKC 的 mRNA 转录减少了 PKC 的表达，从而抑制肝细胞的凋亡。在瑞芬太尼和 CH 混合作用下，肝细胞 PKC 的 mRNA 表达受到了明显的抑制，而其细胞凋亡率却高于单独使用瑞芬太尼或 CH 的组，这又如何解释呢？有研究认为 CH 对蛋白激酶 C(PKC)活力呈剂量依赖性抑制作用(IC_{50} = 0.66 μmol/L)[7]。Ulrichova 等[8]的研究显示，CH 的浓度为 25 ~ 100 μmol/L 时，其对人的原代培养肝细胞表现出剂量和时间依赖性的毒性作用。本实验所选择的 CH 浓度为 10 μmol/L，不仅没有产生细胞毒性，而且有保护作用。由于瑞芬太尼和 CH 均能抑制 PKC 的 mRNA 转录，混合用药相当于增加了 CH 的剂量，可能达到了 CH 产生细胞毒性的剂量范围，因此细胞的凋亡率反而增加了。

当然，瑞芬太尼究竟是通过激活哪种受体而发挥作用，目前尚不清楚。Kato 等[9]认为芬太尼对心肌细胞缺氧损伤具有保护作用，其途径是通过激活阿片受体和阿糖腺苷受体，然后使细胞内的 PKC 活性增加，开放 ATP 敏感性 K 通道(K_{ATP})，减轻线粒体的钙超载。本实验未用阿片受体拮抗剂来检验瑞芬太尼的效应，而且肝细胞中 PKC 的 RT-PCR 结果表明 PKC 的表达会减少，其活力可能会降低。这可能与种属差异或细胞类型的不同有直接的关系。

参考文献：

[1] Jassem W, Heaton N D. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation[J]. Kidney Int, 2004, 66(2): 514 - 517.

[2] 何 英, 李幼平, 李胜富, 等. 缺氧再给氧损伤对人肝细胞 MHC Ⅰ分子相关抗原表达变化的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2005, 36(2): 147 - 149.

[3] 高 毅, 单毓强, 王 渝, 等. 肝细胞缺氧预处理细胞保护作用中热休克蛋白 70 表达的调控机制[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(2): 147 - 149.

[4] 汤礼军, 田伏洲, 王 雨, 等. 肝脏低温保存-再灌注期间肝细胞凋亡及其与 Bax 基因蛋自相关性的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(2): 144 - 146.

[5] Hao X Q, Tao G C, Cui J, *et al*. Study on the protective mechanism of remifentanil on mitochondria in rat hepatocytes subjected to ischemia-reperfusion injury[J]. J Med Coll PLA, 2006, 21(2): 122 - 124.

[6] 王剑明, 邹声泉. 胆盐诱发肝细胞凋亡及蛋白激酶 C 信号通道的作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2000, 6(4): 291 - 293.

[7] 徐学萍, 肖殿模. 蛋白激酶 C 抑制剂的研究概况[J]. 国外医学: 药学分册, 1994, 21(2): 86 - 91.

[8] Ulrichova J, Dvorak Z, Vicar J, *et al*. Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models. The case of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids[J]. Toxicol Lett, 2001, 125(1-3): 125 - 132.

[9] Kato R, Ross S, Foex P. Fentanyl protects the heart against ischaemic injury *via* opioid receptors, adenosine A1 receptors and K_{ATP} channel linked mechanisms in rats[J]. Br J Anaesth, 2000, 84(2): 204 - 214.

(编辑 栾 嘉)