文章编号:1000-5404(2012)17-1779-04

论著

丙泊酚后处理对离体大鼠缺血再灌注心肌的保护作用及机制

刘 柳,庞 勇,何东伟,刘新伟 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院麻醉科)

[摘要] **目的** 研究丙泊酚后处理对离体大鼠缺血再灌注心肌细胞的保护作用以及对 PI3K/Akt 信号通路的影响。**方法** 选用 SD 大鼠 28 只,按照随机数字表法分为缺血再灌注组(I/R 组)、丙泊酚后处理组(PPC 组)、丙泊酚后处理 + Wortmannin 后处理组(PPC + W 组)、Wortmannin 组(W 组)。4 组均建立 Langendorff 离体心肌缺血再灌注模型。各组心肌做相应分组处理后,观察缺血前及再灌注 120 min 时左室心功能变化情况,免疫组化检测 Bcl-2 蛋白的表达,Tunel 法检测各组心肌细胞凋亡情况,Western blot 测定 p-Akt(Ser473)蛋白表达。**结果** 与 I/R 组相比,PPC 组 LVEDP 降低[(43.31 ± 4.70)*vs*(29.93 ± 3.72),$P < 0.05$], + dp/dt_{max} 和 − dp/dt_{max} 均明显升高[(1 140 ± 138)*vs*(1 622 ± 160),(749 ± 99) *vs* (1 008 ± 178),$P < 0.05$],心肌组织 Bcl-2 蛋白和 p-Akt 的表达均增加[(0.171 9 ± 0.012 1)*vs* (0.199 1 ± 0. 014 4),(0.241 4 ± 0.053 9)*vs*(0.436 3 ± 0.081 7),$P < 0.05$],心肌细胞凋亡明显减少[(33.87 ± 1.72)*vs*(29.84 ± 1.83),$P < 0.05$]。Wortmannin 能阻断丙泊酚后处理的心肌保护效应($P < 0.05$)。**结论** 丙泊酚后处理能减少离体大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用,其保护机制与激活 PI3K/Akt 信号通路及上调 Bcl-2 蛋白的表达有关。

[关键词] 丙泊酚;后处理;PI3K/Akt;Bcl-2
[中图法分类号] R654.1; R966; R971.2 [文献标志码] A

Cardioprotective effect of propofol postconditioning on myocardium against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts

Liu Liu, Pang Yong, He Dongwei, Liu Xinwei (Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of propofol postconditioning on myocardium against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts and the role of PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** Twenty-eight rats were randomly divided into four groups including an ischemia-reperfusion group (I/R group), a propofol postconditioning group (PPC group), a propofol postconditioning combined with wortmannin group (PPC + W group) and a wortmannin group (W group). The I/R models of isolated hearts were established in all of the groups. The LVEDP and dp/dt_{max} were measured before ischemia and at 120 min after reperfusion. The expression of Bcl-2 was measured by immunohistochemistry, the apoptotic index was measured by TUNEL, and the expression of p-Akt (Ser473) was measured by Western blotting. **Results** Compared with the I/R group, the LVEDP significantly decreased (43.31 ± 4.70 *vs* 29.93 ± 3.72, $P < 0.05$), and + dp/dt_{max} and − dp/dt_{max} significantly increased in the PPC group (1 140 ± 138 *vs* 1 622 ± 160; 749 ± 99 *vs* 1 008 ± 178, $P < 0.05$). The expression of Bcl-2 and p-Akt in the myocardium of the PPC group was significantly higher than that of the I/R group (0.171 9 ± 0.012 1 *vs* 0.199 1 ± 0.014 4; 0.241 4 ± 0.053 9 *vs* 0.436 3 ± 0.081 7, $P < 0.05$), while the proportion of apoptotic cardiomyocytes decreased significantly in the PPC group as compared with the I/R group (33.87 ± 1.72 *vs* 29.84 ± 1.83, $P < 0.05$). Wortmannin could block the protective effect of propofol postconditioning ($P < 0.05$). **Conclusion** Propofol postconditioning could attenuate the apoptosis in the isolated heart induced by I/R probably through PI3K/Akt signal pathway and Bcl-2 upregulation.

[**Key words**] propofol; ischemic postconditioning; PI3K/Akt; Bcl-2

Corresponding author: Liu Xinwei, Tel: 86-23-89011068, E-mail: xxwwliu@yahoo.com.cn

[通信作者] 刘新伟,电话:(023)89011068,E-mail: xxwwliu@yahoo.com.cn

缺血再灌注所致心肌损伤是心脏外科中常见的并发症,如何减少缺血再灌注损伤,保护再灌注心肌功能是心血管麻醉医师面临的重要挑战。近年研究发现缺血后处理(ischemic postconditioning,I-postC)能激活心肌内源性的保护机制[1-3],减轻缺血再灌注损伤,为心肌保护提供了新的思路。其中激活磷酸肌醇3激酶-丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K/Akt)等促细胞生存信号通路[3]是缺血后处理重要的保护机制。丙泊酚是临床上常用的静脉麻醉药,具有诱导迅速,苏醒快等优点,文献[4]报道其具有心肌保护作用,但现有文献报道丙泊酚心肌保护的机制多集中于其抗氧化、减少活性氧产生等方面,丙泊酚后处理是否具有与缺血后处理相似的激活心肌内源性保护机制的报道则较少。本研究拟建立Langendorff离体大鼠心肌缺血再灌注模型,研究丙泊酚后处理对心肌细胞凋亡的影响,以及PI3K/Akt信号通路和Bcl-2蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性SD大鼠28只,体质量220~250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。随机数字表法分为4组($n=7$):缺血再灌注组(I/R组)、丙泊酚后处理组(PPC组)、丙泊酚+Wortmannin后处理组(PPC+W组)、Wortmannin后处理组(W组)。4组均采用K-H液灌注平衡20 min,全心停灌30 min,再灌注120 min的方式建立离体心肌缺血再灌注模型。I/R组复灌使用普通K-H液再灌注120 min;PPC组于再灌注初用含50 μmol/L丙泊酚的K-H液灌注15 min,再用普通K-H液再灌注105 min;PPC+W组再灌注初用含50 μmol/L丙泊酚和100 nmol/L Wortmannin的K-H液灌注15 min;W组再灌注初用含100 nmol/L Wortmannin的K-H液灌注15 min。

1.2 主要试剂

丙泊酚(AstraZeneca公司,英国),K-H液(NaCl:118.5 mmol/L、$NaHCO_3$:25.0 mmol/L、KCl:4.75 mmol/L、$MgSO_4$:1.2 mmol/L、KH_2PO_4:1.2 mmol/L、$CaCl_2$:2.5 mmol/L、Glucose:11.1 mmol/L),抗Bcl-2和抗BAX单克隆抗体(Santa Cruz公司,美国),免疫组化二抗试剂盒和DAB试剂盒(北京中杉公司,中国),磷酸化Akt(Ser473)和GAPDH单克隆抗体(Bioworld公司,美国),Tunel凋亡检测试剂盒(Roche公司,美国),Wortmannin、二抗和ECL化学发光试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所)。

1.3 动物模型的建立

大鼠腹腔注射肝素2 000 U/kg充分肝素化后,乌拉1.0 g/kg腹腔注射麻醉起效后,迅速开胸,取出心脏,置于95% O_2+5% CO_2混合气饱和的4 ℃ K-H液中,简单修剪心脏周围组织,迅速悬挂于Langendorff离体灌注装置(120101BEZ,Radnoti公司),使用95% O_2+5% CO_2混合气饱和的K-H液恒压灌注,灌注压力90 cmH_2O,循环恒温水浴维持灌注系统在(37±0.5)℃,心脏稳定搏动5 min,剪开左心耳,在左心室内置入带水囊的导管,导管另一端与RM6240B生理信号采集处理系统(成都仪器厂)连接采集血流动力学参数。

1.4 观察指标

1.4.1 心功能指标的测定 分别于缺血前、再灌注120 min,记录左室舒张末压(LVDEP)、左心室压力变化率($\pm dp/dt_{max}$)的变化情况。

1.4.2 免疫组化检测心肌组织Bcl-2表达 取各组同一部位左室心肌组织,石蜡包埋固定切片,煮沸法抗原修复,血清封闭,一抗(1∶100)4 ℃过夜;二抗37 ℃孵育30 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37 ℃孵育30 min;DAB显色,苏木精复染,脱水,晾干,中性树胶封片,阳性产物显微镜下呈棕黄色。每张切片随机选取5个视野,应用Image-Pro Plus图像分析软件测定阳性产物平均灰度值。

1.4.3 Tunel法检测心肌细胞凋亡 取同一部位心肌组织石蜡切片,按凋亡试剂盒说明书操作。镜下选取5个高倍镜(×400)视野,分别计数凋亡细胞数和细胞总数,以凋亡指数(apoptotic index,AI)来反映各组心肌细胞凋亡情况。

AI=凋亡细胞数/心肌细胞总数×100%

1.4.4 Western blot测定心肌组织p-Akt(Ser473)和GAPDH蛋白表达 取各组同一部位心肌组织匀浆提取总蛋白,BCA蛋白质浓度测定,加入loading buffer沸水浴5 min充分变性,上样量40 μg,聚丙酰胺凝胶电泳后,恒流250 mA湿法转膜70 min至PVDF膜,5%的脱脂奶粉TBST中封闭1 h,一抗4 ℃(1∶500)过夜,TBST洗膜10 min×3次,辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶1 000)37 ℃孵育1.5 h,TBST洗膜10 min×3次,ECL试剂盒发光,曝光。p-Akt(Ser473)条带与GADPH的比值百分比表示p-Akt(Ser473)的相对表达量。

1.5 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,心功能指标的比较采用双因素方差分析,其余指标组间比较采用多组间单因素方差分析,两两比较采用SNK法。

2 结果

2.1 心功能指标

各组缺血前心功能指标比较差异无统计学意义($P>0.05$),再灌注120 min时与I/R组比较,PPC组LVEDP降低,$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$明显升高($P<0.05$);与PPC组比较,PPC+W组LVEDP升高,$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$明显降低($P<0.05$);I/R组、PPC+W组、W组之间各指标比较差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

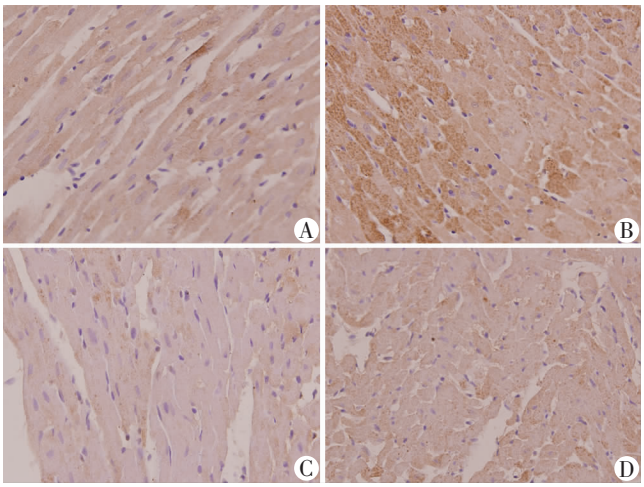
表1 各组大鼠心功能比较($n=7,\bar{x}\pm s$)

组别	LVEDP(mmHg)		$+dp/dt_{max}$(mmHg/s)		$-dp/dt_{max}$(mmHg/s)	
	缺血前	再灌注120 min	缺血前	再灌注120 min	缺血前	再灌注120 min
I/R组	5.71±1.70	43.31±4.70	2 865±169	1 140±138	2 069±136	749±99
PPC组	5.47±1.32	29.93±3.72[a]	2 830±152	1 622±160[a]	2 041±141	1 008±178[a]
PPC+W组	5.80±1.34	42.03±4.68[b]	2 912±198	1 145±121[b]	2 013±137	769±102[b]
W组	5.42±1.17	44.00±4.06	2 885±183	1 107±122	2 026±127	759±125

a:$P<0.05$,与I/R组比较;b:$P<0.05$,与PPC组比较

2.2 免疫组化检测心肌组织 Bcl-2 的表达

与 I/R 组相比，PPC 组 Bcl-2 蛋白表达显著升高（$P<0.05$）；与 PPC 组相比，PPC + W 组 Bcl-2 蛋白表达显著降低（$P<0.05$）；I/R 组、PPC + W 组、W 组之间比较差异无统计学意义（$P>0.05$，图 1、表 2）。



A：I/R 组；B：PPC 组；C：PPC + W 组；D：W 组

图 1　各组大鼠心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达　（S-P ×400）

表 2　各组心肌 Bcl-2、凋亡指数及 p-Akt 蛋白相对表达的比较（$n=7$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Bcl-2	凋亡指数	p-Akt/GAPDH
I/R 组	0.172 ±0.012	33.87 ±1.72	0.241 4 ±0.053 9
PPC 组	0.199 ±0.014[a]	29.84 ±1.83[a]	0.436 3 ±0.081 7[a]
PPC + W 组	0.170 ±0.016[b]	33.73 ±2.37[b]	0.266 2 ±0.042 1[b]
W 组	0.170 ±0.012	35.20 ±2.14	0.233 1 ±0.056 2

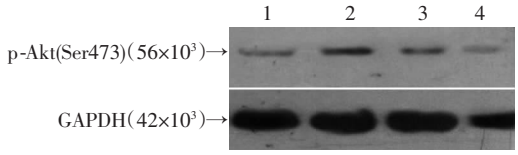
a：$P<0.05$，与 I/R 组比较；b：$P<0.05$，与 PPC 组比较

2.3 Tunel 法检测心肌细胞凋亡指数

与 I/R 组相比，PPC 组凋亡心肌细胞显著减少（$P<0.05$）；与 PPC 组相比，PPC + W 组凋亡心肌细胞显著增加（$P<0.05$）；I/R 组、PPC + W 组、W 组之间比较差异无统计学意义（$P>0.05$，表 2）。

2.4 Western blot 检测心肌组织 p-Akt（Ser473）蛋白的表达

与 I/R 组相比，PPC 组的 p-Akt 表达水平显著升高（$P<0.05$）；与 PPC 组相比，PPC + W 组的 p-Akt 表达水平显著降低（$P<0.05$）；I/R 组、PPC + W 组、W 组之间比较差异无统计学意义（$P>0.05$，图 2、表 2）。



1：I/R 组；2：PPC 组；3：PPC + W 组；4：W 组

图 2　Western blot 检测各组心肌细胞 p-Akt（Ser473）蛋白表达

3 讨论

缺血再灌注损伤所致的心肌细胞凋亡是心肌死亡的重要原因，PI3K/Akt 是细胞内重要的促生存信号通路，其激活能促进缺血再灌注损伤细胞生存，减少细胞凋亡。PI3K 具有脂质激酶和蛋白激酶的双重活性，Akt 是 PI3K 下游主要的调节蛋白，也称为蛋白激酶 B（PKB），PI3K 通过先后磷酸化 Akt 的 Thr308 和 Ser473 位点使 Akt 活化[5-6]。激活的 Akt 通过调控下游的 Bcl-2 蛋白家族、凋亡诱导因子、应激活化蛋白激酶、糖原合酶激酶-3（GSK-3）、Caspase-9 等底物的表达和磷酸化产生抗细胞凋亡的作用[7]。Wortmannin 是 PI3K/Akt 信号通路的特异性抑制剂，能有效抑制 Akt 的磷酸化，本研究参考文献[8]将 Wortmannin 的浓度选择为 100 nmol/L。

Bcl-2 是调控细胞凋亡的重要基因，属于 Bcl-2 基因家族，其表达产物 Bcl-2 蛋白具有抑制细胞凋亡的作用，能抑制 MPTP 开放，从而阻止细胞凋亡[9-10]。Wang 等[11]研究发现，在体外培养的 H9c2 心肌细胞，给予丙泊酚预处理，可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路，上调 Bcl-2 的蛋白表达，从而减轻 H_2O_2 诱导的心肌细胞的凋亡。

本研究选用 Langendorff 离体大鼠心肌缺血再灌注模型，排除了神经体液因素对实验结果的影响。丙泊酚的剂量参照文献[4,12]，研究发现 50 μmol/L 丙泊酚后处理能使缺血再灌注心肌的左室 LVEDP 降低，$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$ 增加，提示丙泊酚后处理能明显改善再灌注心肌功能，其结果与文献[12]相似，证实丙泊酚后处理具有心肌保护作用。实验结果显示丙泊酚后处理组与其他组比较再灌注心肌细胞凋亡明显减少，而 p-Akt、Bcl-2 蛋白的表达明显增加。PI3K/Akt 信号通路的特异性阻断剂 Wortmannin 能阻断丙泊酚后处理抑制心肌凋亡、改善血流动力学的心肌保护效应和上调 p-Akt、Bcl-2 蛋白的表达。综上提示激活 PI3K/Akt 信号通路进而上调 Bcl-2 蛋白，是丙泊酚后处理减少缺血再灌注心肌细胞凋亡、发挥心肌保护的可能机制之一。

Wang 等[11]还发现在丙泊酚预处理的体外培养的 H9c2 心肌细胞，Wortmannin 能阻断 Akt 激活的缺氧复氧后心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达的上调，但是不能阻断丙泊酚诱导的缺氧复氧后心肌细胞的 Bcl-2 mRNA 的转录增加，提示可能其他的信号转导机制参与了丙泊酚预处理诱导的 Bcl-2 基因的上调。因本研究未检测丙泊酚后处理对再灌注的心肌组织相关基因指标的影

响,丙泊酚后处理是否有与预处理相似的对 Bcl-2 基因的影响,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 沈诚, 范士志, 陈建明, 等. 缺血后处理对培养乳鼠心肌细胞模拟缺血再灌注损伤的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(21): 2358 - 2359.

[2] Philipp S, Yang X M, Cui L, *et al*. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade[J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(2): 308 - 314.

[3] Fujita M, Asanuma H, Hirata A, *et al*. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(4): H2004 - H2008.

[4] Shao H, Li J, Zhou Y, *et al*. Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: role of cardiolipin[J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(8): 1641 - 1649.

[5] Su C H, Wang C Y, Lan K H, *et al*. Akt phosphorylation at Thr308 and Ser473 is required for CHIP-mediated ubiquitination of the kinase [J]. Cell Signal, 2011, 23(11): 1824 - 1830.

[6] Mahajan K, Coppola D, Challa S, *et al*. Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation[J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9646.

[7] 赵婧, 屈艺, 母得志. Akt 与细胞线粒体凋亡途径[J]. 生命的化学, 2010, 30(4): 528 - 532.

[8] Yu L N, Yu J, Zhang F J, *et al*. Sevoflurane postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in rat isolated hearts *via* activation of PI3K/Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2010, 11(9): 661 - 672.

[9] Duan X, Ji B, Yu K, *et al*. Acidic buffer or plus cyclosporine A postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury[J]. Perfusion, 2011, 26(3): 245 - 252.

[10] Sun Y, Zhang Y, Yan M, *et al*. B-type natriuretic peptide-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(9): 1545 - 1551.

[11] Wang B, Shravah J, Luo H, *et al*. Propofol protects against hydrogen peroxide-induced injury in cardiac H9c2 cells *via* Akt activation and Bcl-2 up-regulation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 389(1): 105 - 111.

[12] He W, Zhang F J, Wang S P, *et al*. Postconditioning of sevoflurane and propofol is associated with mitochondrial permeability transition pore[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9(2): 100 - 108.

(**收稿**:2012-03-10;**修回**:2012-05-02)

(编辑 黄 超)

经验交流

文章编号:1000-5404(2012)17-1782-01

两种方案治疗外伤性脊髓损伤患者并发症压疮的效果

夏同霞[1],李媛媛[1],王玉和[2],敖 俊[1],谢文婷[1],李琳育[1]

(563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院:骨二科[1],药剂科[2])

[**关键词**] 外伤性脊髓损伤;压疮;加替沙星眼用凝胶;重组人表皮生长因子凝胶

[**中图法分类号**] R632.105 [**文献标志码**] B

压疮主要实质是压迫性溃疡,常合并感染,是导致压疮溃疡面经久不愈的重要原因。外伤性脊髓损伤患者常合并不同程度的瘫痪,大便失禁,更易污染疮面并造成感染,全身应用抗生素因压疮处血液循环差,患处有效药物浓度不易达到,不利于炎症的控制[1]。2009 - 2012 年我科对收治的 52 例Ⅱ ~ Ⅲ期共 56 处压疮患者分别采用加替沙星眼用凝胶联合 rhEGF 治疗及 rhEGF 分组治疗,并进行临床疗效对比,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2009 年 11 月至 2012 年 4 月我科收治的压疮患者。纳入标准:外伤性脊髓损伤,四肢瘫痪或截瘫,臀部、骶尾部或髋部形成压疮;排除标准:年龄大于 75 岁,营养状况极差。共获得 52 例,其中Ⅱ期压疮 26 例 28 处,Ⅲ期压疮 26 例 28 处。患者签订知情同意书,配对分配为治疗组(加替沙星眼用凝胶联合 rhEGF)和对照组(rhEGF)。

1.2 材料

加替沙星眼用凝胶:规格 5 g/支,沈阳兴齐制药有限公司生产;rhEGF:规格 20 g/支,桂林华诺威基因药业有限公司生产。

1.3 方法

按照文献[2]分期标准进行压疮分期评估。对照组:局部有水泡者碘伏消毒后用注射器抽净水泡内液体;有脓性分泌物及坏死组织者行外科清创;用生理盐水将伤口冲洗干净,待干,涂上 rhEGF(厚度约 2 mm,宽度以超过创面 2 cm 为宜),然后用无菌纱布覆盖包扎,1 ~ 2 次/d,待创面肉芽组织新鲜、表皮形成阶段,可每 2 天换 1 次。治疗组:局部有水泡者碘伏消毒后用注射器抽净水泡内液体;有脓性分泌物及坏死组织者行外科清创;用生理盐水将伤口冲洗干净,待干,先将加替沙星眼用凝胶薄薄的涂在伤口创面上,半小时后涂上 rhEGF(厚度约 2 mm,宽度以超过创面 2 cm 为宜),然后用无菌纱布覆盖包扎,1 ~ 2 次/d,待创面肉芽组织新鲜、表皮形成阶段,可每 2 天换 1 次。

1.4 疗效评价标准

痊愈:创面完全愈合;显效:创面显著缩小;进步:创面开始缩小;无效:用药后创面无变化或恶化[3]。

(下转 1796 页)

[**通信作者**] 王玉和,电话:(0852)8608078,E-mail:xtx0925@163.com