DOI:10.16016/j.1000-5404.201606181

七氟烷预处理对大鼠肺缺血再灌注损伤肺组织细胞自噬水平的影响

邓 红[1],高 静[2],廖 林[3],刘金碧[1],鲁开智[2],郑 洪[1],易 斌[2] (563000 贵州 遵义,遵义市第一人民医院麻醉科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院麻醉科[2];401420 重庆,綦江区人民医院麻醉科[3])

[摘要] **目的** 探讨七氟烷预处理对大鼠肺缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury,IRI)肺组织中细胞自噬的影响。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠 75 只,采用开胸夹闭左肺门建立 IRI 模型,将 75 只大鼠编号后按随机数字表法分为 5 组:假手术组(Sham),缺血再灌注组(I/R),七氟烷预处理组(SEVO),LY294002 组(LY)及七氟烷预处理 + LY294002 组(PI3K 抑制剂)(SEVO + LY),各 15 只。缺血 1 h,再灌注 120 min 后处死各组大鼠,取出肺组织,检测大鼠肺组织湿/干重比(W/D),Western blot 法测定肺组织 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 及 p-PI3K 表达。**结果** 与 Sham 组比较,I/R 组肺组织发生严重水肿($P<0.05$),且肺组织细胞自噬水平增加,自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 蛋白表达上调($P<0.05$);与 I/R 组比较,SEVO 组肺水肿明显减轻($P<0.05$),Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 蛋白表达下调,而 p-PI3K 表达增加($P<0.05$),LY 组与 I/R 组比较差异没有统计学意义($P>0.05$);与 SEVO 组比较,SEVO + LY 组中肺水肿明显加重,Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 蛋白表达上调而 p-PI3K 表达下调($P<0.05$)。**结论** 七氟烷预处理通过激活 PI3K 信号转导通路,恢复 LIRI 期间细胞自噬流,减少自噬性细胞死亡从而对肺缺血再灌注损伤起保护作用。

[关键词] 七氟烷;肺缺血再灌注损伤;自噬;PI3K 信号通路

[中图法分类号] R322.35;R364.12;R971.2 [文献标志码] A

Effects of sevoflurane preconditioning on autophagy in lung ischemia-reperfusion injury in rats

Deng Hong[1],Gao Jing[2],Liao Lin[3],Liu Jinbi[1],Lu Kaizhi[2],Zheng Hong[1],Yi Bin[2]([1]Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Zunyi,Zunyi, Guizhou Province,563000;[2]Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038;[3] Department of Anesthesiology, Qijiang Distract People's Hospital, Chongqing,401420, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of sevoflurane preconditioning on function of autophagy in lung ischemia-reperfusion(I/R) injury in rats. **Methods** A lung I/R injury model in rats was established by clamping of the left hilum after thoracotomy. A total of 75 healthy adult male Sprague-Dawley (SD) rats (SPF grade) were randomly divided into 5 groups ($n=15$): sham operation group (Sham), ischemia-reperfusion group (I/R), sevoflurane preconditioning group (SEVO), LY294002 (LY, PI3K inhibitor) group, sevoflurane preconditioning + LY294002 group (SEVO + LY). After 1 h of ischemia and 120 min of reperfusion, the rats were executed and the left lung tissue were harvested for wet-dry weight (W/D) measurement. Western blotting was used to detect the expression of Beclin-1, LC3 Ⅱ/Ⅰ, P62 and p-PI3K. **Results** Compared with the Sham group, I/R group developed severe lung edema ($P<0.05$),

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170053);遵义市科技局项目[遵市科合社字(2014)19 号];重庆市基础科学与前沿技术研究专项项目(CSTC2016jcyjA0120)

[通信作者] 廖 林,E-mail:liaolinmz@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160918.1602.004.html(2016-09-18)

and had increased level of autophagy and its related protein expression of Beclin-1, LC3 Ⅱ/Ⅰ, P62 ($P<0.05$). The pulmonary injury and increased protein expression found in I/R group were significantly reduced in SEVO group ($P<0.05$). Only p-PI3K expression was significantly increased in the SEVO group than the I/R group ($P<0.05$). There were no significant differences between LY group and I/R group in these respects ($P>0.05$). In SEVO + LY group, pulmonary injury was aggravated. The expression of Beclin-1, LC3 Ⅱ/Ⅰ, P62 was up-regulated and p-PI3K level was remarkably decreased compared with SEVO group ($P<0.05$). **Conclusion** The results demonstrated that autophagy was involved in the lung I/R pathophysiological process. Sevoflurane preconditioning can protect the lung I/R injury in rats, which is likely related to activation of PI3K signaling transduction and restoration of autophagic flux, at last reducing autophagic cell death.

[**Key words**] sevoflurane; lung ischemia-reperfusion injury; autophagy; PI3K

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170053), the Project of Zunyi Science and Technology (2014-19) and the Project of Basic Science and Advanced Technology Research of Chongqing (CSTC2016jcyjA0120). Corresponding author: Liao Lin, E-mail: liaolinmz@163.com

目前,针对减轻器官缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury,IRI)的预防措施主要有两大类:手术和药物治疗,手术治疗主要是通过缺血预处理,但由于伦理及技术的限制,在临床操作中未得到广泛推广;药物治疗指各类器官保护药物[1]。七氟烷(sevoflurane,SEVO),一种高效吸入麻醉药,具有可控性强,对呼吸道刺激、血流动力学及交感神经活动影响小等优点,临床应用广。目前,越来越多的研究表明,SEVO 可以对脑[2]、心肌[3]、肝脏[4]、肾脏[5]、肠道[6]等器官缺血再灌注损伤产生保护作用。文献[7]报道称其对 LIRI 也具有保护作用,但相关研究甚少。本实验中,我们探讨 SEVO 是否对 LIRI 具有肺保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠由第三军医大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK 渝 2012-0005,体质量 220~250 g。将 75 只大鼠编号后按随机数字表法分为 5 组,假手术组(Sham),缺血再灌注组(I/R),七氟烷预处理组(SEVO),LY294002 组(LY)及七氟烷预处理 + LY294002 组(PI3K 抑制剂)(SEVO + LY),各 15 只。

参照 Ng 等[8]的方法进行大鼠肺 IRI 建模。对于 Sham 组大鼠仅开胸游离肺门,不做夹闭处理;I/R 组大鼠以无创血管夹夹闭左肺门,1 h 后开放血管,关胸;SEVO 组大鼠于夹毕肺门前 30 min 吸入 2.1% 七氟烷[9];LY 组大鼠夹毕肺门前 30 min 腹腔给予 LY294002 0.3 mg/kg(PI3K 抑制剂)[10];SEVO + LY 组大鼠夹毕肺门前 30 min 吸入 2.1% 七氟烷(批号:H20130816,Maruishi Pharmaceutical 公司,日本),且腹腔给予 LY294002 0.3 mg/kg[10]。于再灌注 120 min 后分别开胸取肺保存。

1.2 大鼠肺组织湿/干质量比(W/D)的测定

取各组大鼠左上肺组织,生理盐水洗净血迹,滤纸搽干表面水迹,以电子天平称取即湿质量(wet),再置入 80 ℃烤箱中,24 h 后称取即干质量(dry),二者之比即 W/D。

1.3 Western blot 法检测大鼠肺组织 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 和 p-PI3K 的表达

抽提各组大鼠左肺组织蛋白并用 BCA 法测其浓度。按照 Western blot 法[11],分别取 40 μg 蛋白进行上样,电泳,转膜,BSA 血清封闭 2 h,分别加入一抗(Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 和 p-PI3K,稀释度 1∶1 000)于 4 ℃冰箱孵育过夜,取出 PVDF 膜,TBST 漂洗 3 次,二抗(1∶5 000)孵育 2 h,化学发光法显色。用 Image J 软件测其灰度值,以目的蛋白灰度值与内参 β-actin 灰度值的比值反映 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 和 p-PI3K 的表达情况。

1.4 统计学处理

采用统计软件 SPSS 13.0 进行分析。所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用双因素方差分析。

2 结果

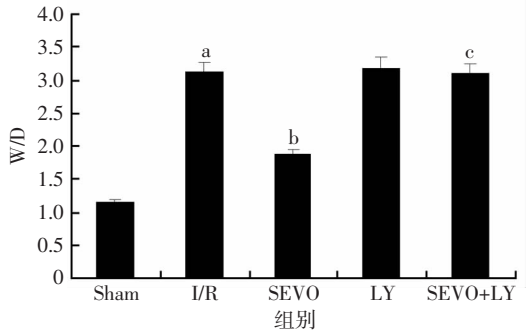
2.1 大鼠肺组织湿/干质量比值(W/D)

与 Sham 组比较,I/R 组的 W/D 值增加($P<0.05$);与 I/R 组比较,SEVO 组 W/D 值显著降低($P<0.05$),而 LY 组与 I/R 组之间没有明显差异($P>0.05$);SEVO + LY 组 W/D 值高于 SEVO 组($P<0.05$,图 1)。

2.2 Western blot 法检测大鼠肺组织自噬水平表达

I/R 组大鼠肺组织 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 表达

明显高于 Sham 组($P<0.05$);与 I/R 组比较,SEVO 组 Beclin-1、LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 表达显著降低($P<0.05$),LY 组与 I/R 组之间差异没有统计学意义($P>0.05$);SEVO+LY 组 Beclin-1、LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 表达高于 SEVO 组($P<0.05$,图 2,表 1)。



a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 I/R 组比较;c:$P<0.05$,与 SEVO 组比较

图 1 各组大鼠肺组织湿重/干重比值($n=15$, $\bar{x}\pm s$)

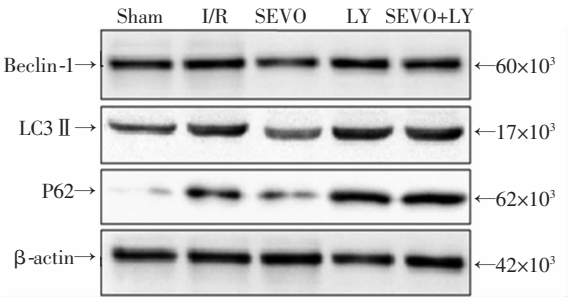


图 2 Western blot 检测各组大鼠肺组织 Beclin-1、LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 的表达情况

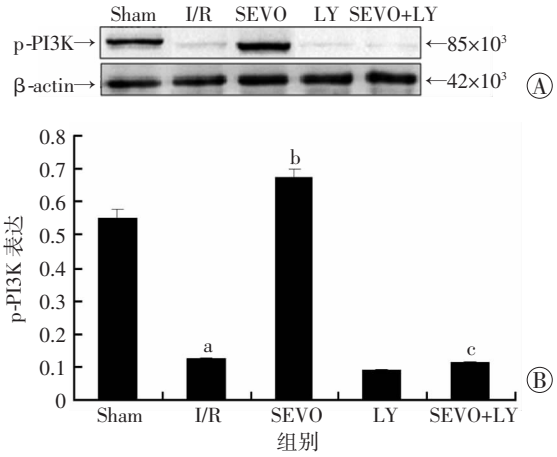
表 1 各组大鼠肺组织 Beclin-1、LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 的表达情况($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

组别	Beclin-1	LC3Ⅱ/Ⅰ	P62
Sham 组	0.42±0.01	0.32±0.02	0.11±0.01
I/R 组	0.63±0.06[a]	0.81±0.08[a]	0.33±0.08[a]
SEVO 组	0.37±0.03[ab]	0.42±0.04[ab]	0.24±0.03[ab]
LY 组	0.66±0.11[ac]	0.73±0.08[ac]	0.53±0.08[ac]
SEVO+LY 组	0.71±0.11[ac]	0.83±0.08[ac]	0.55±0.07[ac]

a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 I/R 组比较;c:$P<0.05$,与 SEVO 组比较

2.3 Western blot 检测大鼠肺组织 p-PI3K 表达

与 Sham 组比较,I/R 组大鼠肺组织 p-PI3K 表达下调($P<0.05$);与 I/R 组比较,SEVO 组 p-PI3K 表达显著增加($P<0.05$);LY 组与 I/R 组比较,p-PI3K 表达差异没有统计学意义($P>0.05$);与 SEVO 组比较,SEVO+LY 组 p-PI3K 表达明显降低($P<0.05$,图 3)。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 I/R 组比较;c:$P<0.05$,与 SEVO 组比较

图 3 Western blot 检测各组大鼠肺组织 p-PI3K 的表达情况

3 讨论

肺缺血再灌注损伤(lung ischemia reperfusion injury, LIRI)多发生于失血性休克、心肺复苏、体外循环、肺移植、一侧病变肺切除后,其中肺移植时,LIRI 发生率可高达 25%[12]。肺组织缺血后的再灌注不仅不能恢复肺功能,反而加重肺结构破坏,最终可发展为急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。LIRI 发生时,肺毛细血管内皮细胞受损,肺泡毛细血管屏障功能障碍,炎症细胞和炎性介质大量渗出,引起肺泡及间质发生水肿,组织细胞死亡。其中 IRI 引起细胞死亡的分子机制尚未阐明,目前较为统一的观点是细胞死亡分为坏死和凋亡两个过程,是否自噬性死亡参与其中有待证明。吸入麻醉药具有保护缺血再灌注损伤(IRI)组织器官的作用,已成为共识。Payne 等[13]研究发现,细胞分裂活化蛋白激酶(MAPK)信号通路参与了吸入麻醉药的脑保护作用。Rancan[14]已证明,七氟烷对急性肺损伤的保护作用与抑制氧化应激反应和减少炎症介质释放有关。

自噬(autophagy)是真核生物进化高度保守的细胞自稳程序。非病理状态下,细胞内本身存在一定水平的自噬,维持内环境的稳定,而过度诱导的自噬能诱发细胞程序性死亡[15]。Beclin-1 是哺乳动物启动自噬过程的特异性基因[15],当 Beclin-1 被活化后,在胞浆中逐渐产生 C 形的双层膜结构,参与自噬体的形成。另外,LC3 蛋白在正常情况下以 LC3 Ⅰ的形式存在于胞浆中,在自噬发生时被切割和脂化成 LC3Ⅱ后,可以与自噬前体和自噬体的内外膜特异结合,且一直结合

到自噬体与溶酶体融合,因此 LC3 Ⅱ 目前被公认为是自噬的生物学标记物[15]。Zhang 等[16]发现自噬在 LIRI 中起到了保护作用,可能与 ERK1/2 信号通路激活有关;另一方面,有研究指出 LIRI 发生时,过度蓄积的自噬体促进细胞凋亡[17]。本实验中,我们发现异常的自噬加重了 LIRI,七氟烷预处理参与肺损伤过程细胞自噬调控,对 LIRI 有保护作用,机制可能与 PI3K 信号通路激活有关。

PI3K,普遍存在胞内的一种磷脂酰肌醇激酶,具有丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶的活性,可调节细胞增殖、分化、凋亡等。文献[18]报道 PI3K 被激活是调控脑 IRI 后神经细胞存活的关键环节,激活的 PI3K 使 Akt 活化,活化的 Akt 又激活 P70S6K,最终抑制细胞凋亡。同时,PI3K 信号转导通路也是诱导自噬产生的通路之一[19]。细胞内生长因子、营养状态及能量水平通过 PI3K /Akt /PKB 通路调节 TORC1 活性,从而激活 mTOR,抑制细胞自噬[20]。完整的自噬过程分为两个阶段:①吞噬包裹所形成的自噬泡;②进一步与溶酶体结合消化,即完整的自噬流(autophagy flux)。P62 蛋白是一种接头蛋白,它可作为自噬受体与泛素化的蛋白质结合,同时与 LC3 Ⅱ 相互作用,从而能够把泛素化的蛋白质运送到自噬体内降解。因此 P62 是反映自噬活性的标记蛋白之一,其含量间接反映自噬小体清除水平[21]。当自噬活性减弱或功能缺陷时,自噬流遭到破坏,P62 会在细胞质中持续累积。Ma 等[22]研究表明,IRI 破坏了自噬泡与溶酶体正常结合过程,使自噬泡大量聚集,最终导致细胞死亡。Zhang 等[23]报道了 SEVO 可以修复完整的自噬流,恢复再灌注期间溶酶体功能,发挥 IRI 心肌保护作用。本研究结果显示,大鼠发生 LIRI 后 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ 蛋白表达上调,说明再灌注后肺组织细胞内自噬被激活,而 P62 蛋白表达上调,说明自噬流被破坏。由此推测 IRI 破坏了肺组织细胞内自噬流,使细胞内自噬体大量积聚,导致肺组织细胞自噬性死亡。同时本研究还显示 SEVO 可以显著降低 LIRI 后自噬体标记性蛋白 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ 以及 P62 的表达,说明 SEVO 可以修复 IRI 过程中自噬流的破坏,进而抑制细胞死亡,有肺保护作用。在给予 PI3K 抑制剂 LY294002 后 Beclin-1、LC3 Ⅱ/Ⅰ 和 P62 蛋白表达上调,肺损伤加重,保护作用消失。这启示我们,SEVO 可能通过 PI3K 途径激活自噬,发挥肺保护作用,对于 PI3K 的磷酸化激活,可能主要是通过促进形成的自噬溶酶体,恢复了自噬流,使自噬发挥其消化降解、循环利用代谢产物的作用,而不是单纯地上调自噬活性,对 LIRI 损伤产生保护作用。

综上所述,SEVO 对大鼠 LIRI 具有保护作用,其机制可能是通过激活 PI3K 信号转导通路,恢复再灌注期间自噬流的完整性,促进自噬体清除,进而抑制细胞死亡。

参考文献:

[1] 戴宁凰, 骆金华, 陈伟, 等. 不同剂量乌司他丁对离体兔肺保护作用的实验研究[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2013, 21(2): 43 - 44. DOI:10.3969/j.issn.1008-5971.2013.02.020

[2] Li D, Huang B, Liu J, *et al*. Decreased brain K(ATP) channel contributes to exacerbating ischemic brain injury and the failure of neuroprotection by sevoflurane post-conditioning in diabetic rats [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73334. DOI: 10.1371/journal.pone.0073334

[3] Xu Y, Ma L L, Zhou C, *et al*. Hypercholesterolemic myocardium is vulnerable to ischemia-reperfusion injury and refractory to sevoflurane-induced protection [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76652. DOI:10.1371/journal.pone.0076652

[4] Yin Y, Yan M, Zhu T, *et al*. Minimum alveolar concentration of sevoflurane in rabbits with liver fibrosis [J]. Anesth Analg, 2012, 114(3): 561 - 565. DOI: 10.1213/ANE.0b013e31823feca7

[5] Zhou S P, Liao W T, Yang L K, *et al*. Effects of sevoflurane pretreatment on renal Src and FAK expression in diabetic rats after renal ischemia/reperfusion injury [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 384(1/2): 203 - 211. DOI: 10.1007/s11010-013-1799-z

[6] 李志鹏, 李玉娟, 何妹仪, 等. 七氟醚后处理对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(3): 357 - 359. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2013.03.026

[7] Watanabe K, Iwahara C, Nakayama H, *et al*. Sevoflurane suppresses tumour necrosis factor-alpha-induced inflammatory responses in small airway epithelial cells after anoxia/reoxygenation [J]. Br J Anaesth, 2013, 110(4): 637 - 645. DOI:10.1093/bja/aes469

[8] Ng C S, Hui C W, Wan S, *et al*. Lung ischaemia-reperfusion induced gene expression [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010, 37(6): 1411 - 1420. DOI:10.1016/j.ejcts.2010.01.001

[9] 李永乐, 安海水, 邓默, 等. 不同浓度七氟烷对急性肺损伤大鼠的保护作用[J]. 中国医药科学, 2013, 3(6): 24 - 25; 28.

[10] 韩军, 宣佳利, 胡浩然, 等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心

肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系[J]. 中国中药杂志, 2015,40(1): 118 - 123. DOI:10.4268/cjcmm20150123

[11] 陈洪涛, 雷春亮, 李宝金, 等. 七氟烷后处理对大鼠缺血/再灌注损伤心功能和 ERK1/2 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2011,27(2): 258 - 264.

[12] Villar J, Blanco J, Blanch L, *et al*. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation [J]. Intensive Care Med, 2011, 37(12): 1932 - 1941. DOI:10.1007/s00134-011-2380-4

[13] Payne R S, Akca O, Roewer N, *et al*. Sevoflurane-induced preconditioning protects against cerebral ischemic neuronal damage in rats [J]. Brain Res, 2005, 1034(1/2): 147 - 152. DOI:10.1016/j.brainres.2004.12.006

[14] Rancan L, Huerta L, Cusati G, *et al*. Sevoflurane prevents liver inflammatory response induced by lung ischemia-reperfusion [J]. Transplantation, 2014, 98(11): 1151 - 1157. DOI:10.1097/TP.0000000000000408

[15] Ryter S W, Choi A M. Autophagy in lung disease pathogenesis and therapeutics [J]. Redox Biol, 2015, 4(147): 215 - 225. DOI: 10.1016/j.redox.2014.12.010

[16] Zhang D, Li C, Zhou J, *et al*. Autophagy protects against ischemia/reperfusion-induced lung injury through alleviating blood-air barrier damage [J]. J Heart Lung Transplant, 2015, 34(5): 746 - 755. DOI: 10.1016/j.healun.2014.12.008

[17] Zhang J, Wang J S, Zheng Z K, *et al*. Participation of autophagy in lung ischemia-reperfusion injury *in vivo* [J]. J Surg Res, 2013, 182(2): e79 - e87. DOI: 10.1016/j.jss.2012.11.014

[18] Schulz R. A new paradigm: cross talk of protein kinases during reperfusion saves life [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(1): H1 - H2. DOI: 10.1152/ajpheart.00886.2004

[19] Xie F, Liu W, Feng F, *et al*. Apelin-13 promotes cardiomyocyte hypertrophy *via* PI3K-Akt-ERK1/2-p70S6K and PI3K-induced autophagy [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015, 47(12): 969 - 980. DOI: 10.1093/abbs/gmv111

[20] 杜涛, 黄海, 陈欣, 等. 脂多糖通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调控巨噬细胞自噬[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(4): 675 - 680. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2014.04.018

[21] Sahani M H, Itakura E, Mizushima N, *et al*. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids [J]. Autophagy, 2014, 10(3): 431 - 441. DOI: 10.4161/auto.27344

[22] 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 - 3181. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041814

[23] Zhang Y L, Yao Y T, Fang N X, *et al*. Restoration of autophagic flux in myocardial tissues is required for cardioprotection of sevoflurane postconditioning in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(6): 758 - 769. DOI: 10.1038/aps.2014.20

(**收稿**:2016-06-06;**修回**:2016-08-23)

(编辑 栾 嘉)