

文章编号 1006-8147(2019)01-0028-04

论著

# 异丙酚通过诱导幼鼠海马神经元线粒体自噬减轻其肝缺血再灌注后脑损伤

吕景淑<sup>1</sup>, 贾莉莉<sup>2</sup>, 喻文立<sup>2</sup>

(1.天津医科大学一中心临床学院麻醉科, 天津 300192; 2.天津市第一中心医院麻醉科, 天津 300192)

**摘要** 目的:探究异丙酚对肝缺血再灌注后幼鼠海马神经元线粒体自噬的影响。方法: C57BL/6 两周龄的小鼠 40 只被随机分成 4 组( $n=10$ ):假手术组(S 组),肝缺血再灌注组(IR 组),异丙酚组(P 组),异丙酚+自噬抑制剂 3-MA 组(3-MA 组),除 S 组仅进行开腹操作外,其余各组均行缺血 60 min,再灌注 6h 建模。取血组织标本及海马组织标本。ELISA 法检测血清中脑损伤标志物神经元特异性烯醇化酶(NSE)和 S100 $\beta$  浓度及炎症因子白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的浓度;透射电镜法观察自噬小体和线粒体超微结构;Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3 II、Nix 及凋亡蛋白 Caspase-3 的表达水平。结果:(1)脑损伤标志物和炎症因子水平,3-MA 组最高,其次为 IR 组,P 组居中,S 组最低( $P<0.05$ );(2)自噬小体,P 组最多,且线粒体结构较完整,依次为 IR 和 S 组,3-MA 组自噬最少,线粒体肿胀,分裂最多;(3)LC3 II、Nix 蛋白表达水平同上述线粒体自噬水平一致,Caspase-3 与此相反( $P<0.05$ )。结论:异丙酚可促进肝缺血再灌注后幼鼠海马神经元的线粒体自噬,减轻炎症反应,减少细胞凋亡。

**关键词** 异丙酚;肝缺血再灌注;海马神经元;线粒体自噬

中图分类号 R614

文献标志码 A

## Propofol alleviated brain damage by inducing mitophagy in hippocampal neurons after hepatic ischemia and reperfusion in young mice

LV Jing-shu<sup>1</sup>, JIA Li-li<sup>2</sup>, YU Wen-li<sup>2</sup>

(1. Department of Anesthesiology, First Center Clinical College, Tianjin Medical Hospital, Tianjin 300192 China; 2. Department of Anesthesiology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

**Abstract Objective:** To explore the effects of propofol on hippocampal neurons mitophagy after hepatic ischemia and reperfusion in young mice. **Methods:** Two-week old C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups ( $n=10$ ): sham operation group (group S); hepatic ischemia-reperfusion group (group M); propofol group (group P); propofol+ 3-MA group (group 3-MA). Besides the sham group that only had abdominal open and close operations, the rest of the groups underwent 60min ischemia and reperfusion for 6h. Blood samples and brain tissues were collected. ELISA was used to detect brain injury markers: neuron specific enolase (NSE), S100 $\beta$  and inflammatory factors: interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); transmission electron microscope (TEM) was used to observe the structure of autophagosome and mitochondria; protein LC3 II, Nix, caspase-3 expression levels were assessed by Western blot. **Results:** (1) Concentrations of brain injury markers and inflammatory factors were highest in group 3-MA, followed by group IR, group P, and group sham ( $P<0.05$ ); (2) the number of autophagosome was biggest in group P, followed by group IR, group S and group 3-MA; mitochondria structure was relatively unbroken in group S, followed by group P, group IR and group 3-MA; (3) LC3 II and Nix protein expression levels were consistent with TEM results, while caspase-3 was opposite ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Propofol can promote hippocampal neurons mitophagy after hepatic ischemia and reperfusion in young mice, and reduce inflammation and cell apoptosis.

**Key words** propofol; hepatic ischemia and perfusion; hippocampal neurons; mitophagy

肝移植是终末期肝病患儿的唯一治疗手段。随着手术技术和术后管理的进步,儿童肝移植患者术后 5 年生存率高达 80%以上<sup>[1]</sup>。2012 年以后,每年婴

幼儿患者为主的胆道闭锁在我国儿童肝移植中的占比达到 75%以上<sup>[2]</sup>。然而,大多数患儿都会发生术后神经系统并发症<sup>[3]</sup>,发生率在 9%~48%之间,且明显高于成人。肝缺血再灌注是肝移植术中必不可少的步骤,研究证明,该过程可造成多个远隔脏器如:心、肺、肾、脑、肠等的损伤<sup>[4]</sup>。异丙酚是临床上常用的麻醉药,大量实验证明,它可通过抑制小胶质细胞活化<sup>[5]</sup>,抑制内质网应激介导的凋亡<sup>[6-7]</sup>,减轻炎症反应<sup>[8]</sup>等多种途径发挥脑保护作用。线粒体自噬是

基金项目 天津市卫生行业重点攻关项目(16KG101);天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题(2017056);天津市自然科学基金面上项目(17JCYBJC28000);2017 年天津医学会麻醉分会中青年科研培育基金项目(TJMZZJ-2017-01)

作者简介 吕景淑(1994-),女,硕士在读,研究方向:肝缺血再灌注后的脑损伤;通信作者:喻文立, E-mail: yzyuwenli@163.com。

选择性自噬的一种,对于维持细胞内和组织内的稳态具有重要的作用。关于异丙酚对肝缺血再灌注后幼鼠海马神经元线粒体自噬的影响研究甚少,本研究就此进行探讨。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 2周龄 C57BL/6 雄雌不分的小鼠,体质量约 6~8 g(华阜康生物科技股份有限公司提供),饲养在干净、恒温恒湿的环境中,自由摄取食物和水。随机分为 4 组:假手术组(S 组),肝缺血再灌注组(IR 组),异丙酚组(P 组),异丙酚+自噬抑制剂 3-MA 组(3-MA 组)。

1.2 动物模型的构建 参照文献<sup>[9]</sup>建立小鼠 70%肝热缺血再灌注模型。术前采用 50  $\mu\text{g/g}$  的戊巴比妥腹腔内注射麻醉,麻醉后将小鼠固定在手术台上,沿腹白线纵行切口入腹,暴露手术视野,应用棉签将肝门附近肠管等脏器轻轻推至左髂区,游离第一肝门。用血管夹夹闭肝左、中叶脉管(门脉、动脉与胆道)的共干,此时缺血肝叶变白,淤血肝叶颜色加深,70%的肝脏热缺血模型造模成功。将腹腔内脏器归位,临时合拢腹腔,用无菌纱布遮盖腹壁切口,缺血 1 h 后松开血管夹,随后关腹缝合切口。S 组仅开腹、游离第一肝门以及 1 h 后关腹等操作,无血管夹闭,P 造模前 30 min 腹腔注射异丙酚(20 mg/kg,阿斯利康,美国),3-MA 组造模前 30 min 腹腔注射异丙酚 20 mg/kg 和 5  $\mu\text{L}$  溶于 PBS 的 3MA(100 nmol/ $\mu\text{L}$ ),S 和 IR 组在开腹前 30 min 腹腔内注射等量乳化剂。该模型动物死亡率约为 10%,4 只老鼠多死于造模初期,死亡原因主要包括麻醉意外致死(2 只),手术过程粗暴导致流血过多(1 只),血管夹闭过深(1 只),每死亡 1 只即刻重新造模补齐该组的数目。

1.3 标本采集与制作 再灌注后 6 h,各组小鼠摘眼球取血标本,3 500 r/min 离心 15 min,取血清,保存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 以待检测 ELISA。剥离完整脑组织,一份用多聚甲醛固定保存,以备后期的石蜡切片。快速分离脑组织中的海马组织,用刀片切取海马 CA1 区 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 组织块保存在 2.5%戊二醛固定液置于 4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,以备观察透射电镜。将海马组织保存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于后期检测 Western blot。

1.4 ELISA 法测脑损伤标志物及炎症因子 参照南京建成生物有限公司的试剂盒说明书,采用双抗体夹心法,经包被、加样、加酶标抗体、加底物显色、终止反应等步骤,最后计算出各组 NSE、S100 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的浓度。

1.5 透射电镜法观察自噬小体和线粒体形态 取出 2.5%戊二醛固定液固定后的海马组织标本,PBS

冲洗 3 次,1% 四氧化锇固定液固定 1 h,PBS 清洗 3 次,在丙酮和双蒸水按比例配制 50%、70%、80%、90%、100%(V/V)的浓度梯度进行脱水,进行包埋渗透,制成超薄切片 60 nm,用 1%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,在透射电子显微镜下观察每个标本海马神经元内自噬小体和线粒体的形态结构。

1.6 Western blot 法测 LC3 II、Nix、Caspase-3 蛋白的表达情况 取冰冻海马组织,进行称重,研磨,以质量:体积=1:10 的比例加入蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂及磷酸化酶抑制剂。脑组织匀浆放冰上裂解,每隔 10 min 震荡 1 次,30 min 后,4  $^{\circ}\text{C}$  13 000 r/min 离心 20 min,取上清,BCA 法进行蛋白定量。配制 12%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,蛋白上样量为 50  $\mu\text{g}$ ,随后转印至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),室温下 5%脱脂牛奶封闭 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min,随后加入 1:1 000 一抗 LC3 II、Nix、Caspase-3(均购于美国 CST 公司),置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜。TBST 清洗 3 次,每次 10 min;加入 1:2 000 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(购于北京中杉金桥公司),于室温下摇床孵育 1 h,TBST 清洗 3 次,每次 10 min;加入显色液避光显影曝光,系统照相记录实验结果。采用 ImageJ 图像分析软件测定蛋白条带的灰度值,以 LC3 II、Nix、Caspase-3 分别与内参  $\beta$ -actin(1:1 000,购于美国 CST 公司)灰度值的比值反应目的蛋白的表达水平。

1.7 统计学处理 用 SPSS 19.0 进行统计学分析处理。正态分布计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析。GraphPad Prism 6 制造图表分析, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组脑损伤标志物及炎症因子的表达水平 与 S 组相比,IR 组、P 组、3-MA 组 NSE、S100 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  均有所增加,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),与 IR 组相比,P 组的各项指标下降,3-MA 组各项指标上升,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ )(表 1)。

表 1 血清 NSE、S100 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  浓度的比较( $n=10,\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 concentrations of NSE,S100 $\beta$ ,IL-6 and TNF- $\alpha$ ( $n=10,\bar{x}\pm s$ )

组别	NSE/(ng/mL)	S100 $\beta$ /(mg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF- $\alpha$ /(pg/mL)
S 组	14.21 $\pm$ 0.76	1.34 $\pm$ 0.06	36.7 $\pm$ 2.9	42.5 $\pm$ 4.3
IR 组	30.14 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup>	2.06 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	119.7 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	105.7 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>
P 组	23.94 $\pm$ 2.14 <sup>ab</sup>	1.73 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	78.2 $\pm$ 3.1 <sup>ab</sup>	70.5 $\pm$ 5.9 <sup>ab</sup>
3-MA 组	38.66 $\pm$ 0.87 <sup>ab</sup>	2.38 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	131.7 $\pm$ 5.2 <sup>ab</sup>	113.7 $\pm$ 8.6 <sup>ab</sup>

与 S 组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 IR 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

2.2 各组自噬体及线粒体结构 透射电镜可观察到自噬小体和线粒体超微结构,两组结果综合提

示:与 S 组相比,IR 组、P 组、3-MA 组线粒体数量均有所下降,且线粒体形态结构紊乱,线粒体肿胀增加,自噬小体增多;与 IR 组相比,P 组线粒体数量增多,线粒体结构较完整,自噬小体数量增多,3-MA 组,线粒体数量和质量均下降,且自噬小体数量减少(图 1)。

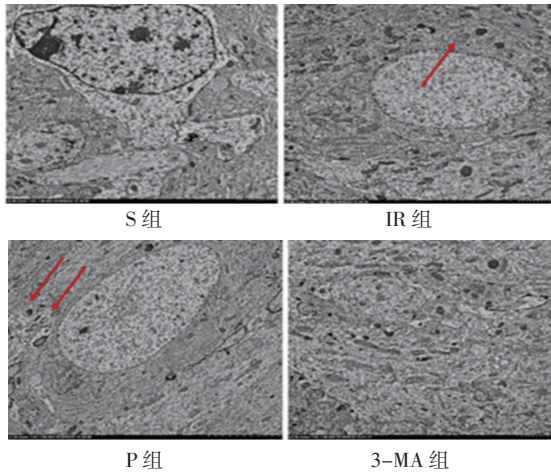


图 1 各组电镜结果的比较( $\times 5\ 000$ )

Fig 1 Results of TEM in each group ( $\times 5\ 000$ )

2.3 各组 LC3 II、Nix、Caspase-3 蛋白的表达情况  
与 S 组相比,IR 组、P 组、3-MA 组的 LC3 II、Nix、Caspase-3 蛋白表达水平上升,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),与 IR 组相比,P 组的 LC3 II、Nix 蛋白表达水平上升,但 Caspase-3 蛋白表达水平下降,3-MA 组的 LC3 II、Nix 蛋白表达水平下降,但 Caspase-3 蛋白表达水平上升,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )(图 2)。

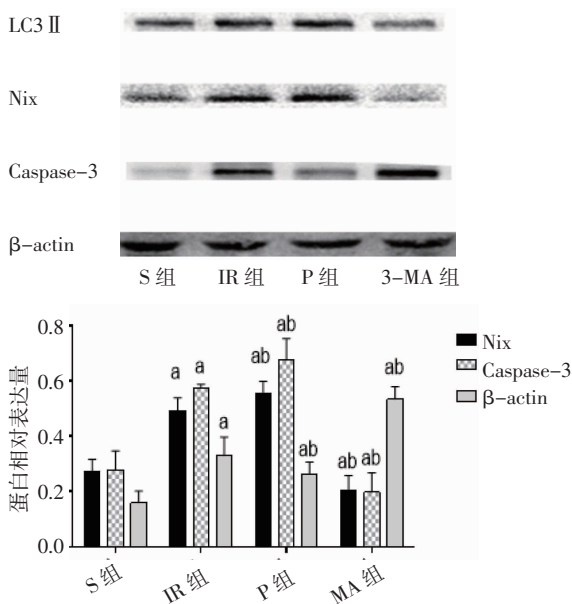


图 2 各组 LC3 II、Nix、Caspase-3 蛋白的表达情况

Fig 2 expressions of LC3 II, Nix and Caspase-3 proteins in each group

### 3 讨论

3.1 线粒体自噬在肝缺血再灌注之脑损伤中的作用  
自噬是细胞通过溶酶体降解蛋白和受损细胞器的过程,选择性清除线粒体即为线粒体自噬。线粒体自噬是细胞实现线粒体质量控制的主要途径,对维持细胞稳态至关重要。Nix 是定位于线粒体外膜的一类 BNIP3 蛋白,参与了线粒体自噬的 Parkin 非依赖途径。有文献报道,其氨基酸序列中含有 WXXL 基序。Nix 能通过该基序与 LC3 及 LC3 同源物 CABA 受体相关蛋白结合,诱导线粒体自噬发生从而降解清除多余的线粒体。Zhang 等证明了在低氧的情况下,可以通过 BNIP3 依赖的方式诱导激活线粒体自噬<sup>[10]</sup>。Wu 等研究发现在缺氧状态下,Nix 可激活线粒体自噬<sup>[11]</sup>。有研究表明,Sirt1 可通过恢复线粒体自噬水平减轻肝缺血再灌注损伤<sup>[12-13]</sup>。然而,SONG 等实验研究显示 FOXO3a 可通过抑制肝细胞线粒体自噬和抑制细胞凋亡减轻小鼠肝缺血再灌注损伤<sup>[14]</sup>。

在本实验中,相对于 S 组,IR 组的透射电镜结果显示自噬小体数量增加,且线粒体肿胀明显,线粒体自噬相关蛋白 Nix、LC3 II 表达量增高,凋亡蛋白 Caspase-3 表达量增多,脑损伤标志物 NSE、S100β 和炎症因子 IL-6、TNF-α 水平也明显增加,然而加入自噬抑制剂 3-MA 后,线粒体自噬水平明显降低,但电镜结果显示损伤的线粒体数量反而增加,凋亡蛋白 Caspase-3 及脑损伤标志物 NSE、S100β 和炎症因子 IL-6、TNF-α 水平进一步增加。以上结果说明,肝缺血再灌注后,线粒体自噬可能起到保护作用,通过及时清除受损的线粒体,以抑制其释放氧化自由基,从而控制氧化应激损伤,抑制该过程则会引起炎症反应加剧,凋亡增加。

3.2 异丙酚对肝缺血再灌注后小鼠海马神经元线粒体自噬的影响  
异丙酚是临床常用的静脉麻醉药,现已有多项研究证明异丙酚可对自噬产生影响。Kim 等<sup>[15]</sup>、Chang 等<sup>[16]</sup>、Li 等<sup>[17]</sup>、Yoon 等<sup>[18-19]</sup>均证实了异丙酚诱导自噬的产生,减轻氧化应激损伤。然而,Cui 等<sup>[20]</sup>、Li 等<sup>[21]</sup>、Chen 等<sup>[22]</sup>、Yang 等<sup>[23]</sup>研究却发现异丙酚可抑制自噬从而发挥保护或加重损伤的作用。

本实验研究中,与 IR 组相比,P 组,透射电镜结果显示自噬小体数量增加,且线粒体结构破坏减少,线粒体自噬相关蛋白 Nix、LC3 II 表达量增高,而凋亡蛋白 Caspase-3 表达量却下降,脑损伤标志物 NSE、S100β 和炎症因子 IL-6、TNF-α 水平也明显降低,该实验结果说明,线粒体自噬本身在肝缺



血再灌注后起一定的保护作用,然而,IR组自噬流或许受到了一定的抑制,异丙酚可恢复肝缺血再灌注线粒体自噬流的抑制作用,或者,异丙酚可进一步激活线粒体自噬,从而起到保护作用。

**3.3 本实验的不足及临床应用建议** 本实验研究仅仅从脑损伤标志物和凋亡蛋白水平研究其对大脑的影响,显然不足以对其脑保护作用下结论,并且本实验为短期实验,未研究其长期的影响结果。本实验样本数量偏小,结论需大量动物实验和临床实验加以证实。关于异丙酚诱导线粒体自噬的机制及其上下游的影响因素未进行探讨。今后应继续探索其具体信号通路,积极寻找在肝缺血再灌注中的脑保护措施。

#### 参考文献:

- [1] Yazigi N A. Long term outcomes after pediatric liver transplantation[J]. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2013,16(4):207
- [2] Wan P, Xu D, Zhang J, et al. Liver transplantation for biliary atresia: A nationwide investigation from 1996 to 2013 in mainland China[J]. *Pediatr Transplant*, 2016,20(8):1051
- [3] Bernhardt M, Pflugrad H, Goldbecker A, et al. Central nervous system complications after liver transplantation: common but mostly transient phenomena[J]. *Liver Transpl*, 2015,21(2):224
- [4] Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014,2014:906965
- [5] Wang W, Lu R, Feng D Y, et al. Inhibition of microglial activation contributes to propofol-induced protection against post-cardiac arrest brain injury in rats[J]. *J Neurochem*, 2015,134(5):892
- [6] Wang L, Tang W, Jiang T, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effect of propofol[J]. *Neurochem Res*, 2014,39(9):1741
- [7] Nakajima A, Tsuji M, Inagaki M, et al. Neuroprotective effects of propofol on ER stress-mediated apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014,725:47
- [8] Shi S S, Yang W Z, Chen Y, et al. Propofol reduces inflammatory reaction and ischemic brain damage in cerebral ischemia in rats[J]. *Neurochem Res*, 2014,39(5):793
- [9] 麻勇,汪大伟,刘连新,等.小鼠肝脏部分缺血再灌注损伤模型的建立[J]. *中华消化外科杂志*, 2013,12(9):703
- [10] Zhang J, Randall M S, Loyd M R, et al. Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and -independent mechanisms during reticulocyte maturation[J]. *Blood*, 2009,114(1):157
- [11] Wu H, Chen Q. Hypoxia activation of mitophagy and its role in disease pathogenesis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015,22(12):1032
- [12] Qin J, Zhou J, Dai X, et al. Short-term starvation attenuates liver ischemia-reperfusion injury (IRI) by Sirt1-autophagy signaling in mice[J]. *Am J Transl Res*, 2016,8(8):3364
- [13] Ding S, Jiang J, Zhang G, et al. Resveratrol and caloric restriction prevent hepatic steatosis by regulating SIRT1-autophagy pathway and alleviating endoplasmic reticulum stress in high-fat diet-fed rats[J]. *PLoS One*, 2017,12(8):e183541
- [14] 宋虎,张建军,王振,等. FOXO3a 调控线粒体自噬在肝脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. *天津医药*, 2017(12):1242
- [15] Kim E J, Choi I S, Yoon J Y, et al. Effects of propofol-induced autophagy against oxidative stress in human osteoblasts[J]. *J Dent Anesth Pain Med*, 2016,16(1):39
- [16] Chang C Y, Chen P H, Lu S C, et al. Propofol-enhanced autophagy increases motility and angiogenic capacity of cultured human umbilical vascular endothelial cells[J]. *Life Sci*, 2015,142:49
- [17] Li H, Zhang X, Tan J, et al. Propofol postconditioning protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation injury by inducing autophagy via the SAPK/JNK pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018,17(3):4573
- [18] Yoon J Y, Jeon H O, Kim E J, et al. Propofol protects human keratinocytes from oxidative stress via autophagy expression[J]. *J Dent Anesth Pain Med*, 2017,17(1):21
- [19] Yoon J Y, Baek C W, Kim E J, et al. Propofol protects against oxidative stress-induced COS-7 cell apoptosis by inducing autophagy[J]. *J Dent Anesth Pain Med*, 2017,17(1):37
- [20] Cui D R, Wang L, Jiang W, et al. Propofol prevents cerebral ischemia-triggered autophagy activation and cell death in the rat hippocampus through the NF- $\kappa$ B/p53 signaling pathway[J]. *Neuroscience*, 2013,246:117
- [21] Li P, Hao X C, Luo J, et al. Propofol Mitigates Learning and Memory Impairment After Electroconvulsive Shock in Depressed Rats by Inhibiting Autophagy in the Hippocampus[J]. *Med Sci Monit*, 2016,22:1702
- [22] Chen X, Li K, Zhao G. Propofol Inhibits HeLa Cells by Impairing Autophagic Flux via AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Activation and Endoplasmic Reticulum Stress Regulated by Calcium[J]. *Med Sci Monit*, 2018,24:2339
- [23] Yang N, Li L, Li Z, et al. Protective effect of dapsone on cognitive impairment induced by propofol involves hippocampal autophagy[J]. *Neurosci Lett*, 2017,649:85

(2018-06-13 收稿)