

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.23.022

舒芬太尼预处理在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用 及其与 p38 MAPK 关系的研究*

谢丽萍,代志刚[△],王 胜,刘 扬,董希玮,张振英
(石河子大学医学院第一附属医院麻醉科,新疆石河子 832000)

摘要:目的 研究舒芬太尼预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其可能的作用机制。方法 健康 SD 大鼠 30 只,雌雄不拘,体质量 220~270 g,随机分为 5 组($n=6$):假手术组(I组);肝缺血再灌注组(II组);5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 舒芬太尼预处理组(III组);p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)阻断剂 SB203580+III组(IV组)和溶剂剂二甲基亚砜(DMSO)组(V组),至灌注 240 min 时取材。抽取腹主动脉血测定血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性;处死大鼠,收集肝组织,观察肝组织丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的变化;光学显微镜下观察肝组织病理学改变;Western blotting 法测定肝右叶组织 p-p38 MAPK 的表达水平。结果 与 I 组相比,II~V 组血清 ALT、AST,肝组织 MDA 水平显著升高,出现病理学损伤;与 II 组相比,III 组血清 ALT、AST 及肝组织 MDA 水平均明显下降,肝组织 SOD 水平明显升高,病理学损伤减轻,p-p38 MAPK 表达明显升高;与 III 组相比,应用 p38 MAPK 阻断剂 SB203580,肝损伤加重;V 组与 II 组各指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 舒芬太尼预处理可减轻大鼠肝缺血再灌注损伤,其机制可能是通过激活 p38 MAPK 信号通路发挥作用。

关键词: p38 丝裂原活化蛋白激酶;舒芬太尼;肝脏;缺血再灌注损伤;应激反应

中图分类号:R541

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)23-3037-03

Protective effect and mechanism of sufentanil preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury by activating p38 mitogen-activated protein kinases signal pathway*

Xie Liping, Dai Zhigang[△], Wang Sheng, Liu Yang, Dong Xiwei, Zhang Zhenying
(Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of the Medical College,
Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of sufentanil preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats and to investigate the mechanisms whether may be by activating p38 MAPK signal pathway to promote p38 MAPK phosphorylation. **Methods** Thirty SD rats (in either gender, weighing 220-270 g) were randomly divided into five groups: Sham-operated group (I), ischemia-reperfusion group (II); sufentanil preconditioning group (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, III), SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK) group (IV), and dimethyl sulphoxide (DMSO) control group (V). Sample specimens were collected from each group at 240 minutes after reperfusion. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured by an automatic biochemical analyzer. Malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue was measured. HE staining was used to observe the hepatic pathological changes, and to examine the expression of phosphor-p38 mitogen-activated protein kinases (p-p38 MAPK) of hepatic tissues by western blotting. **Results** Compared with group I, levels of AST, ALT and MDA showed significantly increased in group II-V, but levels of SOD decreased, and obvious pathological changes were observed in the liver. In Group III significantly decreased the elevated levels of ASL, ALT and MDA but increased levels of SOD, and lessened hepatic pathological changes, caused promoted p38 MAPK phosphorylation at 240 minutes after reperfusion. The protective effects of sufentanil preconditioning were abolished by SB203580 pretreatment. There were no significant differences between group V and group II. **Conclusion** Sufentanil preconditioning can reduce the hepatic ischemia-reperfusion injury. The protective mechanisms may be by activating p38 MAPK signal pathway to promote p38 MAPK phosphorylation.

Key words: p38 mitogen activated protein kinase; sufentanil; hepatic; ischemia-reperfusion injury; stress response

肝脏手术中阻断血流不可避免诱发肝缺血再灌注损伤,严重影响肝脏功能及预后^[1-2],因此,明确其机制具有十分重要的意义。在肝缺血再灌注损伤中,许多细胞因子和胞内外信号通路参与其中。p38 丝裂原蛋白激酶(p38 MAPK)是 MAPK 家族成员之一,在把细胞外刺激转导到胞内信号通路中起重要作用,可能参与了炎症、应激、细胞周期调控等病理、生理过程^[3-4]。阿片受体激动剂和吸入麻醉药能模拟缺血预处理(IPC)的效应,通过 IPC 的作用机制发挥脏器保护作用,使脏器对随后的长时间缺血和损伤产生一定的耐受性^[5]。然而,对于阿片类物质在脏器保护中作用机制的探索,特别是干扰哪些通路仍然有待探究^[6]。舒芬太尼是阿片受体激动剂,在阿片类

制剂中效应最强,并且由于其具有良好的血流动力学稳定性,使得舒芬太尼在围术期得到广泛应用。舒芬太尼预处理可以通过激活阿片类受体对缺血再灌注心肌产生延迟性保护作用^[7]。舒芬太尼对心肌缺血再灌注损伤的保护作用已被证实,而其对肝脏缺血再灌注损伤方面的研究报道较少,其作用机制是否与 p38 MAPK 信号通路有关还有待进一步探讨。本研究拟观察舒芬太尼在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用,探讨其与 p38 MAPK 信号通路的关系,为明确其在肝脏中的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

* 基金项目:石河子大学自然科学一般-联合基金课题(ZRKXYB-LH05)。

作者简介:谢丽萍(1980—),硕士研究生,主治医师,主要从事

临床麻醉工作。△ 通讯作者,Tel:13677536767;E-mail:dzg2009@sina.com。

1.1.1 实验动物 清洁级健康 SD 大鼠 30 只,雌雄不拘,体重 220~270 g,由新疆医科大学医学院实验动物中心提供,喂养环境为恒温动物房(20~24 °C),12 h 光照和 12 h 黑夜交替。

1.1.2 实验药品及试剂 舒芬太尼(批号:2120807 A3)由宜昌人福药业有限公司提供,谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,*p*-p38 MAPK 一抗、二抗由美国 CellSignaling 公司提供,SB203580 由美国 Selleck 公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将 30 只 SD 大鼠随机分为 5 组($n=6$): 假手术组(I 组)、缺血再灌注组(II 组)、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 舒芬太尼预处理组(III 组)、*p*-p38 MAPK 特异性阻断剂 SB203580(SB)+III 组(IV 组)及二甲基亚砜(DMSO)组(V 组)。

1.2.2 实验步骤 参照 Nauta 法建立大鼠肝脏局部缺血再灌注模型^[8]。实验大鼠用 20% 乌拉坦 1 mg/kg 腹腔注射麻醉,仰卧固定于恒温手术台,常规消毒,气管切开接动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司)行机械通气。呼吸频率 60~65 次/min,潮气量 15 mL/kg,吸呼比 4:5,同时行颈外静脉置管。取上腹正中口,暴露第一肝门,分离肝十二指肠韧带, I 组仅行开腹,游离肝十二指肠韧带,不做缺血处理; II 组进腹后采用无损伤动脉夹阻断肝左叶和中叶肝蒂,造成约 70% 的肝脏缺血,缺血 30 min 后移去动脉夹; III 组于缺血前将预计量的舒芬太尼稀释到 0.3 mL,使用微量注射泵按 0.2 mL/min 经颈外静脉泵入,30 min 后再行缺血处理; IV 组于 III 组前 5 min 静脉注射 SB203580 0.2 mg/kg; V 组于缺血前静脉注射与溶解 SB203580 等体积的 DMSO; I 组及 II 组则给予 0.3 mL 生理盐水。各组分别于再灌注 240 min 时取材, I 组则于开腹游离肝十二指肠韧带 240 min 后取材。

1.2.3 标本采集和检测 抽取腹主动脉血 2 mL,常温下 3 000 r/min 离心 15 min 分离血清,离心半径为 8 cm,使用紫外分光光度计测血清 ALT、AST 活性;处死大鼠,取肝左叶 100 mg,制备肝组织匀浆、离心,采用紫外分光光度法测定上

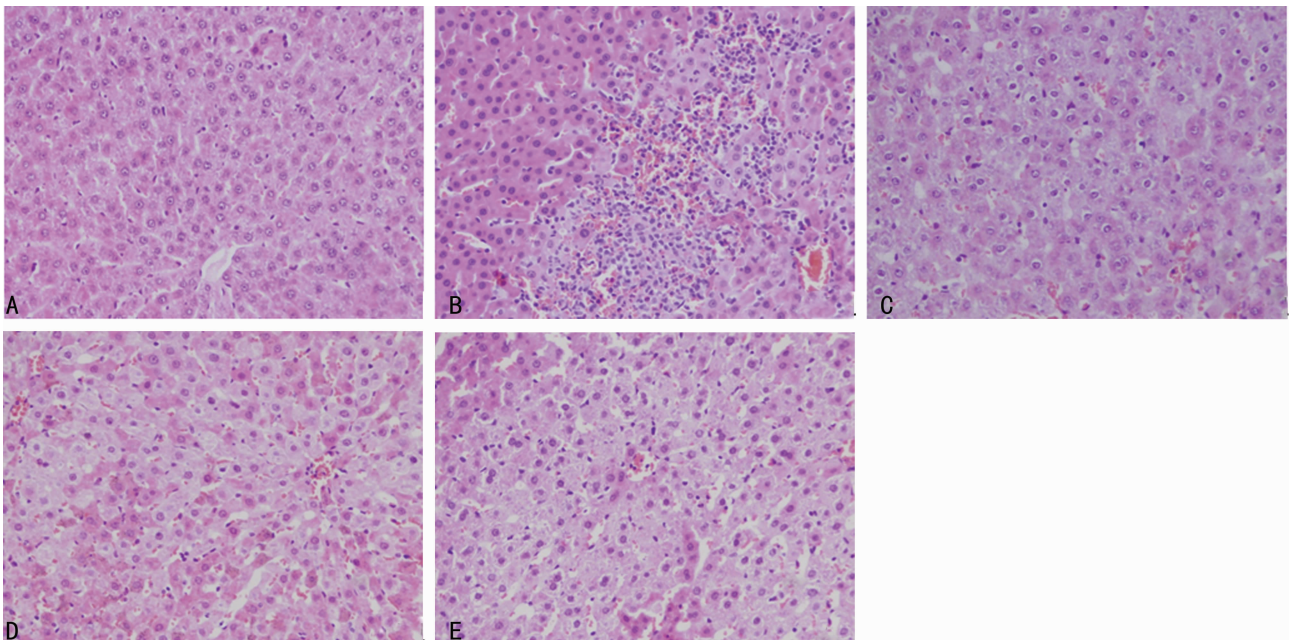
清液 MDA 浓度及 SOD 活性;取新鲜肝左叶 2.0 cm×3.0 cm×0.3 cm,10% 甲醛固定 24 h 后常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红染色,200 倍光学显微镜下观察病理结果;采集肝中叶 1 cm×1 cm×1 cm 大小的肝组织,采用 Western blotting 法检测 *p*-p38 MAPK 的表达水平。用 RIPA 蛋白裂解液提取肝脏组织总蛋白。BCA 法测蛋白浓度,取 15 μg 总蛋白上样,10% SDS 一聚丙烯酰胺凝胶电泳后行半干转膜至 PVDF 膜上,用 2% 牛血清清蛋白(BSA)的 Tris 缓冲盐溶液封闭过夜,洗脱后加入 *p*-p38 MAPK 兔抗鼠单抗(一抗 1:1 000)或兔抗鼠 β -actin 单抗(一抗 1:2 000)4 °C 冰箱摇床过夜,洗膜后用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:30 000)室温孵育 2 h。ECL 试剂显色,暗室 X 光胶片曝光,应用 Quantity One 图像分析软件检测各组 *p*-p38 MAPK 及其内参蛋白条带积分光密度值,以 *p*-p38 MAPK 条带积分光密度值与 β -actin 条带积分光密度值的比值反映蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间和组内比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

与 I 组相比, II~V 组血清 ALT、AST,肝组织 MDA 水平明显升高,SOD 明显下降($P<0.05$);与 II 组相比, III 组及 IV 组血清 ALT、AST 及肝组织 MDA 水平均下降,肝组织 SOD 水平升高($P<0.05$), V 组各指标比较差异无统计学意义($P>0.05$); III 组与 IV 组相比血清 ALT、AST,肝组织 MDA 水平明显降低,SOD 水平明显升高,见表 1、2。

光学显微镜下观察各组肝组织病理学改变, I 组未见明显肝细胞坏死改变,肝小叶及肝细胞索结构完整、未见灶性坏死,中央静脉、肝窦均正常; II 组、IV 组及 V 组可见不同程度肝中央静脉、肝窦内淤血,肝细胞肿胀,广泛肝细胞变性坏死,汇管区炎症细胞聚集,部分肝组织结构破坏不完整; III 组未见显著组织结构破坏,部分肝细胞气球样变,未见成片状细胞坏死,肝小叶结构完整,淤血明显减轻。见图 1。



A: I 组; B: II 组; C: III 组; D: IV 组; E: V 组。

图 1 各组大鼠肝细胞染色结果(HE, ×200)

各组肝组织 *p*-p38 MAPK 蛋白表达见图 2。舒芬太尼预处理 *p*-p38 MAPK 蛋白表达明显增强。与 I 组相比, II~V

组 *p*-p38 MAPK 蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$);与 II 组相比, III 组蛋白表达明显增强($P<0.05$), V 组则差异无统

计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 1 各组大鼠血清 ALT 和 AST 的变化
(U/L, $\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	ALT(金氏法)	AST(金氏法)
I 组	98.00±1.41	202.40±1.90
II 组	2128.64±9.96*	2687.84±12.71*
III 组	1744.80±15.18*#	2304.56±8.04*#
IV 组	1900.40±7.02*#▼	2459.04±6.65*#▼
V 组	2135.20±7.88*△▼◇	2670.40±15.23*△▼◇

*: $P<0.05$, 与 I 组比较; #: $P<0.05$, △: $P>0.05$, 与 II 组比较; ▼: $P<0.05$, 与 III 组比较; ◇: $P<0.05$, 与 IV 组比较。

表 2 各组大鼠肝组织 MDA 和 SOD 的变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
I 组	10.37±0.52	32.75±5.11
II 组	64.40±2.56*	16.25±1.24*
III 组	18.03±0.77*#	120.12±1.54*#
IV 组	60.11±2.35*#▼	28.67±3.23*#▼
V 组	63.82±1.56*△▼◇	15.08±0.51*△▼◇

*: $P<0.05$, 与 I 组比较; #: $P<0.05$, △: $P>0.05$, 与 II 组比较; ▼: $P<0.05$, 与 III 组比较; ◇: $P<0.05$, 与 IV 组比较。



图 2 各组大鼠肝细胞 p-p38 MAPK 蛋白表达的变化

表 3 各组大鼠肝组织 p-p38 蛋白表达的比较
(与 β -actin 灰度值比)($\bar{x}\pm s$)

组别	p-p38/ β -actin
I 组	0.0819±0.0020
II 组	0.0012±0.0016*
III 组	0.6523±0.0024#
IV 组	0.0022±0.0031△
V 组	0.0011±0.0023▼

*: $P<0.05$, 与 I 组比较; #: $P<0.05$, 与 II 组比较; △: $P>0.05$, 与 III 组比较; ▼: $P<0.05$, 与 IV 组比较。

3 讨论

本研究参照文献法进行 70% 肝血流阻断, 建立大鼠肝脏缺血再灌注模型^[8]。血清 ALT、AST 活性是衡量肝脏损伤程度的敏感指标。结果显示, 与假手术组大鼠比较, 肝脏缺血再灌注大鼠血清 ALT、AST 活性明显升高, 肝组织结构破坏不完整, 肝细胞水肿, 肝中央静脉、肝窦内淤血, 汇管区有炎细胞聚集, 提示肝缺血再灌注模型制备成功。

近年来, 药物预处理是肝脏保护的研究热点之一。其中各种麻醉药的肝脏保护作用也越来越受到重视。研究发现 μ 受体激动剂也可减轻缺血再灌注损伤, 其减轻缺血再灌注损伤是 μ 阿片受体通路增加嗜中性粒细胞肽链内切酶激活从而减少 L-选择素和细胞间黏附分子-1 释放来实现^[9]。舒芬太尼是阿片受体激动剂, 起效快, 消除半衰期短, 镇痛作用强, 对血流动力学影响小, 广泛用于临床。研究发现它可能通过下丘脑-垂体-肾上腺轴及交感神经系统发挥抑制作用, 降低参与应激的各种激素及细胞因子水平。本研究发现, 舒芬太尼预处理降低肝缺血再灌注损伤大鼠血清 ALT、AST, 减少肝组织 MDA 生成, 增强 SOD 活性, 其中 MDA 含量可以间接反映组织细胞脂质过氧化反应的程度和速度, 即舒芬太尼预处理减轻细胞受损伤程度^[10]。

有研究发现, 5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 舒芬太尼进行预处理可对大鼠产生剂量相关性延迟性心肌保护作用^[7]。1~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 舒芬太尼后处理减轻大鼠肠缺血再灌注时肺损伤。本研究选择舒芬太尼预处理剂量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。研究结果发现, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 舒芬太尼能够抑制肝缺血再灌注肝脏的炎症反应, 提高抗氧化能力, 减轻脂质过氧化反应, 这些保护作用与激活 p38 MAPK 信号通路有关, 即 p-p38 MAPK 蛋白表达增加。实验结果显示, 舒芬太尼预处理诱导 p-p38 MAPK 在恢复灌注 240 min 时表达明显增加, 其机制可能是通过激活 p38 MAPK 信号通路, 使 p38 MAPK 磷酸化。而在肝缺血前应用 p38 MAPK 特异性阻断剂 SB203580 后, 舒芬太尼的保护作用消除, 而且 V 组与 II 组相比未产生保护作用, 表明溶解剂二甲基亚砜在肝缺血再灌注损伤中无保护作用。

综上所述, 舒芬太尼预处理可能通过激动阿片受体, 激活 p38 MAPK 信号传导通路, 使 p38 MAPK 磷酸化, 降低应激反应, 抑制炎症反应, 减轻肝细胞损伤, 从而减轻肝组织 IR 损伤。本研究从整体动物的水平证实了舒芬太尼预处理的肝脏保护作用, 并探讨了 p38 MAPK 信号通路在舒芬太尼预处理肝缺血再灌注损伤中的作用, 为肝缺血再灌注损伤的治疗提供了可能的实验依据。

参考文献:

- [1] Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry [J]. *Hepatology*, 2002, 36(1): 94-102.
- [2] Ushitora M, Sakurai F, Yarmguchi T, et al. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors [J]. *J Control Release*, 2010, 142(3): 431-437.
- [3] Li Q, Han LP, Li ZH, et al. Salvianolic acid B alleviate the disruption of blood-brain barrier in rats after cerebral ischemia-reperfusion by inhibiting MAPK pathway [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2010, 45(12): 1485-1490.
- [4] Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAPkinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(4 Sup): N67-N77.
- [5] Mastrorandi P, Cafiero T. Rational use of opioids [J]. *Minerva Anestesiologica*, 2001, 67(5): 332-337.
- [6] Stefano GB, Neenan K, Cadet P, et al. Ischemic preconditioning-an opiate constitutive nitric oxide molecular hypothesis [J]. *Med Sci Monit*, 2001, 7(6): 1357-1375.
- [7] 刘鲲鹏, 孙海涛, 薛富善. 不同剂量舒芬太尼预处理对大鼠的延迟性心肌保护作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2009, 29(5): 405-408.
- [8] Nauta RJ, Taimoyiannis E, Uribe M, et al. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat [J]. *Surg Gyneol Obstet*, 1990, 171(2): 120-125.
- [9] Wang TL, Chang H, Hung CR, et al. Morphine preconditioning attenuates neutro philaetivation in rat models of myocardial infarction [J]. *Cardioovase Res*, 1998, 40(3): 557-563.
- [10] Ajamieh HH, Candelario-Jalil E, Fernández OS, et al. Ischaemia and pharmacological preconditionings protect liver via adenosine and redox status following hepatic ischaemia /reperfusion in rats [J]. *Clin Sci*, 2008, 115(2): 69-77.