

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.010

## 丙泊酚预处理对大鼠肢体缺血再灌注损伤的影响

李 喆, 卢一郡, 吕立文, 卢国浩, 李 卫, 俞 宁, 卢俊宇

(广西壮族自治区人民医院急诊科, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的** 观察丙泊酚对大鼠肢体缺血再灌注损伤的影响。**方法** 选择健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 分为假手术组、缺血再灌注组、丙泊酚药物组, 每组 20 只, 各组又根据再灌注时间分成 4 个亚组。复制大鼠经典右下肢缺血再灌注模型, 恢复血流灌注前 5 min 用丙泊酚注射液 (50 mg/kg, 腹腔注射) 处理, 分别于再灌注后 3、6、9、12 h 进行取材, 检测血清样本中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 水平、肌肉组织中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的水平, 以及计算肌肉湿干质量比值。**结果** 恢复灌注后各时间段内, 相对于缺血再灌注组, 丙泊酚处理后能降低 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 抑制组织 MDA 水平增加 ( $P < 0.05$ ), 抑制 SOD 水平的减少 ( $P < 0.05$ ), 也明显减轻肌肉组织的水肿 ( $P < 0.05$ )。**结论** 丙泊酚预处理可通过抑制炎症因子表达、减轻氧自由基损伤从而对缺血再灌注肢体具有保护作用。

**[关键词]** 丙泊酚; 肢体; 缺血再灌注损伤; 炎症因子; 氧自由基**[中图分类号]** R459.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2337-03

## Protective effect of propofol preconditioning on limb ischemia reperfusion injury in rats

Li Zhe, Lu Yijun, Lyu Liwen, Lu Guohao, Li Wei, Yu Ning, Lu Junyu

(Department of Emergency, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of propofol on rat's limb ischemia reperfusion injury. **Methods** Sixty healthy SD rats were randomly divided into sham operate group, ischemia-reperfusion group and propofol group ( $n=20$ ), each group was divided into 4 subgroups according to the different reperfusion time. To copy the right lower limb ischemia reperfusion model, 5 min before reperfusion, use propofol injection (50 mg/kg, intraperitoneal inject), various subjects in the corresponding time points (3, 6, 9, 12 h) were sacrificed. TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B of blood and MDA, SOD of Skeletal muscle were measured, calculate muscle wet dry weight ratio. **Results** Compared with ischemia reperfusion group, propofol could significantly reduce expression of TNF-alpha, NF- $\kappa$ B levels in serum ( $P < 0.05$ ), inhibit the increase of the MDA level and decrease of the SOD level in muscle ( $P < 0.05$ ), also reduce the extent of skeletal muscle cell edema ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Propofol can attenuate limb ischemia reperfusion injury by inhibiting inflammation response and reducing the oxygen free radicals' damage.

**[Key words]** propofol; limb; ischemia-reperfusion injury; inflammatory factor; oxygen free radicals

肢体缺血这一病理现象常见于肢体大血管损伤、血栓再通、断肢再植、止血带使用时间过长等, 恢复缺血肢体血流再灌注后, 肢体的细胞功能代谢障碍及结构破坏并未减轻反而加重, 这种血液再灌注使缺血性损伤进一步加重的现象称为缺血/再灌注损伤<sup>[1]</sup> (ischemia-reperfusion injury, IRI), 其发生、发展主要与炎性细胞因子介导的损伤机制相关<sup>[2]</sup>。丙泊酚是临床常用的静脉麻醉药, 近年来研究表明其对有一定的保护作用<sup>[3-4]</sup>。本研究采用大鼠肢体缺血-再灌注 (IR) 模型, 观察丙泊酚对缺血肢体的保护作用, 并从炎症因子、氧自由基等方面探讨其作用机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 选择健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 180~230 g。分为 3 组: 假手术组 (C 组, 20 只)、缺血再灌注组 (IR 组, 20 只)、丙泊酚干预组 (P 组, 20 只), 每组 20 只, 各组根据恢复组织再灌注时间不同分为 3、6、9、12 h 共 4 个亚组, 每亚组 5 只。

**1.2 主要试剂与仪器** 大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (96T)、大鼠核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ELISA 试剂盒 (96T) 均购自美国 R&D 公司, 进口分装。丙二醛 (MDA) 测试盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒由南京建成

生物工程研究所提供。丙泊酚由 AstraZeneca 公司提供。

## 1.3 方 法

**1.3.1 动物模型制备** 各组大鼠术前 12 h 禁食, 自由饮水。予 3% 戊巴比妥钠 (首剂 40 mg/kg, 维持量 20 mg/kg) 腹腔注射, 麻醉成功后行仰卧位固定。IR 组: 常规备皮后, 于右腹股沟处沿血管走向纵行切开皮肤、皮下组织, 并钝性分离缝匠肌后部, 游离股动静脉和股神经。用微血管夹分别将股动静脉夹闭, 阻断血流, 并用张力带于股鞘下环扎肢体, 以阻断侧支循环。肢体缺血 2 h 后, 在除去微血管夹及张力带即恢复血流灌注前 5 min, 腹腔注射生理盐水 1 mL, 随即除去微血管夹及张力带, 恢复血流灌注。C 组: 游离出股动静脉后, 不上微血管夹和张力带, 即不阻断血流, 余操作同 IR 组。P 组: 肢体缺血 2 h 后, 在除去微血管夹及张力带即恢复血流灌注前 5 min, 腹腔注射丙泊酚注射液 (50 mg/kg), 余操作同 IR 组。

**1.3.2 动物处理及采集标本** 各组大鼠经上述不同处理后, 按所在亚组要求, 分别在恢复血流再灌注 3、6、9、12 h 后再次行腹腔麻醉并固定, 迅速开腹分离出下腔静脉后抽取血样 3 mL, 注入抗凝管内封存。所取血液静置 1 h 后以 3 000 r/min 离心 10 min, 提取血清标本, 注入 EP 管后 -70 °C 保存。游离右下肢腓肠肌上下两端, 组织剪断离后, 分成 2 段, 其中 1 段置

入甲醛溶液固定,备用于肌肉组织匀浆液的制备,另 1 段直接称取湿质量,并记录数值。

**1.3.3 血浆标本检测** 采用双抗体夹心 ELISA 测定,在酶标仪 450 nm 波长处测各孔吸光度(A)值,通过标准曲线计算各血清样本中 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 的水平。具体步骤严格按照试剂盒(美国 R&D 公司)说明书进行操作。

**1.3.4 肌肉标本检测** 称取 100 mg 肌肉组织,加入 0.9 mL 生理盐水制成 10% 的组织匀浆,分别采用硫代巴比妥酸(TPA)法及黄嘌呤氧化酶法,检测肌肉组织中 MDA 的水平,以及 SOD 的活性。严格按照试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书操作。

**1.3.5 组织湿/干质量比** 各组大鼠右下肢肌肉取材并称取湿质量后,分别记录好数值。然后置于 55 °C 恒温箱中烤干至恒重,即为干质量,分别记录好干质量数值。计算出湿质量与干质量的比值,以此反映肌肉组织的水肿程度。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内、组间两两比较采用完全随机设计方差分析(One-Way ANOVA)及 SNK 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组血清 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 的表达** TNF- $\alpha$  组间比较:与 C 组相比,IR 组水平在再灌注后 6、9、12 h 这 3 个时点均显著升高( $P < 0.05$ );P 组水平在再灌注后 6、12 h 这两个时点有升高( $P < 0.05$ )。与 IR 组相比,P 组水平在 4 个时点的表达均显著降低( $P < 0.05$ )。TNF- $\alpha$  组内比较:C 组各时点水平间无明显差异;IR 组水平自再灌注后 3 h 开始升高,至 9 h 达高峰,12 h 后有下降;P 组水平则是再灌注后 6 h 及 12 h 偏高,变化无明显规律,见表 1。

NF- $\kappa$ B 组间比较:与 C 组相比,IR 组水平在再灌注后 4 个时点均显著升高( $P < 0.05$ )。与 IR 组相比,P 组水平在再灌注后 9、12 h 均显著降低( $P < 0.05$ )。NF- $\kappa$ B 组内比较:C 组水平再灌注后 4 个时点均无明显差异;IR 组水平自再灌注后 3 h 开始升高,至 12 h 达高峰;P 组水平再灌注后 4 个时点差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 1 各组大鼠血清中 TNF- $\alpha$  水平变化  
( $\bar{x} \pm s$ , ng/L,  $n = 20$ )

组别	3 h	6 h	9 h	12 h
C 组	119.14 ± 16.93	123.07 ± 17.70 <sup>b</sup>	121.48 ± 15.99 <sup>b</sup>	127.13 ± 17.46 <sup>b</sup>
IR 组	124.31 ± 22.13	213.21 ± 49.49 <sup>bc</sup>	215.85 ± 59.67 <sup>bc</sup>	192.00 ± 34.69 <sup>bc</sup>
P 组	115.15 ± 29.71 <sup>b</sup>	156.92 ± 17.31 <sup>ab</sup>	114.75 ± 39.26 <sup>b</sup>	146.03 ± 17.41 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 3 h 组比较。

表 2 各组大鼠血清中 NF- $\kappa$ B 水平变化  
( $\bar{x} \pm s$ , ng/L,  $n = 20$ )

组别	3 h	6 h	9 h	12 h
C 组	195.62 ± 24.01	207.23 ± 17.68	204.22 ± 25.24	213.10 ± 31.54
IR 组	319.53 ± 37.98 <sup>a</sup>	365.56 ± 54.43 <sup>bc</sup>	398.30 ± 50.58 <sup>bc</sup>	544.41 ± 62.51 <sup>abcd</sup>
P 组	369.00 ± 33.80	348.43 ± 45.63	221.04 ± 37.73 <sup>b</sup>	339.15 ± 39.23 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 3 h 组比较;<sup>d</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 9 h 组比较。

**2.2 各组肌肉组织 MDA、SOD 表达变化** 各时间点 IR 组中

MDA 的水平均明显高于 C 组及 P 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 IR 组 SOD 活性则显著低于 C 组与 P 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组内不同时段 MDA 与 SOD 变化水平均无明显规律,见表 3、4。

表 3 各组大鼠腓肠肌 MDA 水平变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 20$ )

组别	3 h	6 h	9 h	12 h
C 组	2.58 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.56 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.09 <sup>a</sup>
IR 组	2.66 ± 0.09	2.85 ± 0.10	2.84 ± 0.15	2.81 ± 0.76
P 组	2.56 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.53 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.11 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 组比较。

表 4 各组大鼠腓肠肌 SOD 活性变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 20$ )

组别	3 h	6 h	9 h	12 h
C 组	85.61 ± 9.53 <sup>a</sup>	80.28 ± 11.65 <sup>a</sup>	88.12 ± 10.91 <sup>a</sup>	83.55 ± 7.06 <sup>a</sup>
IR 组	62.24 ± 8.43	65.61 ± 5.87	69.36 ± 7.20	64.76 ± 8.81
P 组	82.40 ± 12.71 <sup>a</sup>	90.24 ± 10.96 <sup>a</sup>	85.73 ± 6.83 <sup>a</sup>	88.39 ± 8.61 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 组比较。

**2.3 各组大鼠右下肢肌肉组织湿质量/干质量** 同时点间比较,IR 组各时段湿质量/干质量均显著高于 C 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );P 组则显著低于 IR 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组组内不同时段比较,湿质量/干质量随时间变化有一定上升趋势,见表 5。

表 5 各组大鼠腓肠肌湿质量/干质量比值变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 20$ )

组别	3 h	6 h	9 h	12 h
C 组	3.50 ± 0.10	3.68 ± 0.22	3.61 ± 0.23	3.91 ± 0.22
IR 组	3.85 ± 0.36 <sup>a</sup>	4.73 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.78 ± 0.43 <sup>a</sup>	4.72 ± 0.51 <sup>a</sup>
P 组	3.75 ± 0.18 <sup>ab</sup>	4.15 ± 0.22 <sup>ab</sup>	4.32 ± 0.44 <sup>ab</sup>	4.26 ± 0.47 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与 IR 组比较。

## 3 讨论

肢体缺血在临床中十分常见,肢体 IRI 这一病理生理过程的发生、发展机制,目前认为主要有炎症因子反应学说及氧自由基损伤学说两种<sup>[5-6]</sup>。肢体 IRI 能够引起 NF- $\kappa$ B 的活化,使 NF- $\kappa$ B 的表达量显著增加<sup>[7]</sup>,NF- $\kappa$ B 的激活可增强 TNF- $\alpha$  基因转录,使其水平升高。TNF- $\alpha$  是机体重要的炎性因子<sup>[8]</sup>,广泛参与应激、感染及 IRI 等过程和调控,其水平异常升高可直接作用于细胞,使组织细胞溶解<sup>[9]</sup>,还可引起血管内皮细胞形态和细胞骨架结构的变化,使其功能受损,破坏凝血机制,形成血栓,从而进一步加重远端骨骼肌的水肿。IRI 时可通过线粒体、白细胞及花生四烯酸等产生大量氧自由基<sup>[10]</sup>,氧自由基能够直接损伤细胞膜结构,而产生脂质过氧化链式反应来破坏细胞<sup>[11]</sup>。MDA<sup>[12]</sup>是自由基连锁反应-脂质过氧化反应的终产物,可间接反映机体组织受氧自由基攻击的严重程度;SOD 是生命体的活性物质,能够还原过氧化物,减少活性氧簇的产生,保护细胞不受氧自由基损伤,反映了机体清除氧自由基的能力<sup>[13]</sup>。

本研究通过复制大鼠肢体 IRI 模型,通过观察上述 4 个指标在再灌注后多个时点的变化,结果证明,IR 组各时段 NF- $\kappa$ B 的水平均高于 C 组,提示肢体在恢复血流灌注 3 h 内,NF- $\kappa$ B 已被激活,其升高促进 TNF- $\alpha$  的表达,后者在再灌注 6 h 左右

开始升高,并持续至恢复血流灌注 12 h;而氧自由基爆发引起脂质过氧化反应,使得组织 MDA 水平在再灌注 6 h 左右开始升高,到 12 h 也未下降。另一方面,骨骼肌的湿质量/干质量也客观反映了肌肉的水肿程度,IR 组各时段肌肉湿质量/干质量均高于 C 组。丙泊酚作为临床常用麻醉药物,众多实验证明其对肢体及多脏器的 IRI 具有保护作用。本实验中,P 组大鼠血清 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  的表达,与 IR 组比较,在再灌注各时段均有不同程度的下降,提示药物对炎症因子的释放存在抑制作用;其次,与 IR 组相比,P 组中 MDA 的水平较低,而 SOD 的表达则较 IR 组升高,提示丙泊酚能够降低 IRI 后肌肉组织 MDA 水平,并增强 SOD 活性,表明丙泊酚可有效抑制 IRI 损伤所导致的氧自由基爆发效应,清除氧自由基,抑制脂质过氧化反应;此外,对比肌肉组织湿质量/干质量,说明丙泊酚组骨骼肌组织较 IRI 组水肿程度有所减轻。

综上所述,丙泊酚对 IRI 损伤的肢体具有保护作用,与其能遏制炎症因子表达、减轻氧自由基损害有关。但是,IRI 损伤是一个多因素、多机制、多途径综合作用的结果,临床治疗应更具针对性。本研究证实了丙泊酚对肢体 IRI 损伤防治的有效性,有关药物的剂量及用药的时间还需细化与更进一步探讨。

#### 参考文献

- [1] Mccord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury[J]. *N E J Med*,1985,312(3):159.
- [2] Esposito E,Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16 (24): 3152-3167.
- [3] Wang Z, Kou D, Li Z, et al. Effects of propofol-dexametomidine combination on ischemia reperfusion-induced cerebral injury [J]. *Neuro Rehabilitation*, 2014, 35 (4): 825-834.
- [4] 郑海燕. 丙泊酚麻醉对围手术期肝缺血再灌注损伤患者血浆一氧化氮/内皮素-1 和炎症细胞因子的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(23): 3995-3997.

- [5] Wanderer AA. Proposed pathobiologic mechanisms of hypoxia-ischemia-reperfusion in corticosteroid-resistant neutrophilic asthma and consideration of interleukin 1 targeted therapy [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2011, 106 (1): 69-72.
- [6] Schmidt CA, Rancic Z, Lachat ML, et al. Hypothermic, initially oxygen-free, controlled limb reperfusion for acute limb ischemia [J]. *Ann Vasc Surg*, 2015, 29(3): 560-572.
- [7] Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M. Development of cell-selective targeting systems of NF kappaB decoy for inflammation therapy [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2008, 128(2): 209-218.
- [8] Dabhi B, Mistry KN. In silico analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in human TNF- $\alpha$  gene [J]. *Meta Gene*, 2014(2): 586-595.
- [9] Niu X, Huang WH, De Boer B, et al. Iron-induced oxidative rat liver injury after non-heart-beating warm ischemia is mediated by tumor necrosis factor  $\alpha$  and prevented by deferoxamine [J]. *Liver Transpl*, 2014, 20(8): 904-911.
- [10] Ozsoy M, Gonul Y, Bal A, et al. Effect of IL-18 binding protein on hepatic ischemia-reperfusion injury induced by infrarenal aortic occlusion [J]. *Ann Surg Treat Res*, 2015, 88(2): 92-99.
- [11] Faghihi M, Alizadeh AM, Khori V, et al. The role of nitric oxide, reactive oxygen species, and protein kinase C in oxytocin-induced cardioprotection in ischemic rat heart [J]. *Peptides*, 2012, 37(2): 314-319.
- [12] 张良,代维,高志明,等. 血必净注射液和丹参注射液治疗兔肢体缺血再灌注损伤的比较研究 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(31): 3724-3731.
- [13] Bajpai A, Verma AK, Srivastava M, et al. Oxidative stress and major depression [J]. *J Clin Diagn Res*, 2014, 8(12): 4-7.

(收稿日期:2015-12-23 修回日期:2016-02-26)

(上接第 2336 页)

- in triple-negative breast cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(9): 1160-1169.
- [9] Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, et al. Prognostic impact of Skp2, ER and PGR in male and female patients with soft tissue sarcomas [J]. *BMC Clin Pathol*, 2013, 13 (1): 9.
- [10] Caraballo JM, Acosta JC, Cortés MA, et al. High p27 protein levels in chronic lymphocytic leukemia are associated to low Myc and Skp2 expression, confer resistance to apoptosis and antagonize Myc effects on cell cycle [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(13): 4694-4708.
- [11] Chen XM, Bai Y, Zhong YJ, et al. Wogonin has multiple anti-cancer effects by regulating c-Myc/SKP2/Fbw7 $\alpha$  and

HDAC1/HDAC2 pathways and inducing apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79201.

- [12] Barré B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(4): 524-538.
- [13] Wang J, Huang Y, Guan Z, et al. E3-ligase Skp2 predicts poor prognosis and maintains cancer stem cell pool in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5591-5601.

(收稿日期:2015-12-18 修回日期:2016-03-02)