

肠缺血灌流时异丙酚对肠上皮细胞凋亡的影响

赵京禹, 郝建华, 李平, 郭徽

■背景资料

肠上皮细胞和细胞间紧密连接是构成肠黏膜机械屏障的重要组成部分, 直接与外界细菌及毒素直接接触。严重应激状态下, 肠上皮细胞的损害使肠黏膜的通透性增加, 造成细菌及内毒素的移位, 引起肠源性内毒素血症和脓毒症。这一过程与脓毒症和MODS的发生有密切关系。为此, 减轻肠上皮细胞损害一直是临床研究热点之一。

赵京禹, 郝建华, 李平, 郭徽, 中国人民解放军总医院第一附属医院麻醉科 北京市 100037

赵京禹, 在读医学博士, 主要从事麻醉基础与临床的研究。
通讯作者: 赵京禹, 100037, 北京市海淀区阜城路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院麻醉科。zoubai185@163.com
电话: 010-68159178

收稿日期: 2007-01-11 修回日期: 2007-09-03

Effects of propofol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion injury

Jing-Yu Zhao, Jian-Hua Hao, Ping Li, Hui Guo

Jing-Yu Zhao, Jian-Hua Hao, Ping Li, Hui Guo, Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Correspondence to: Jing-Yu Zhao, Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, 51 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100037, China. zoubai185@163.com
Received: 2007-01-11 Revised: 2007-09-03

Abstract

AIM: To investigate the effects of propofol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion (I/R) injury.

METHODS: Ninety-six Wistar rats were randomly divided into three groups: sham operation, control (I/R + saline) and propofol (I/R + propofol) groups. Propofol (0.1 mg/kg) was injected into the guts of rats in the I/R + propofol group immediately after the superior mesenteric artery (SMA) was clipped. The rate of apoptosis of intestinal epithelial cells was determined using the TdT-mediated d-UTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method. The expression of Caspase-3 and bcl-2 proteins in intestinal epithelial cells was examined by immunohistochemistry. Pathological changes in gut epithelial cells were assessed by Chiu's scores. Measurements were taken at 0, 30, 60, 120 and 240 minutes after reperfusion.

RESULTS: The rate of apoptosis of intestinal epithelial cells ($P < 0.01$) and the levels of Caspase-3 protein were significantly lower in the

I/R + propofol group than that in the control group at 0, 30, 60, 120 and 240 minutes after reperfusion (104.4 ± 5.3 vs 146.4 ± 7.6 ; 97.4 ± 6.2 vs 130.4 ± 7.4 ; 134.4 ± 5.1 vs 170.4 ± 8.1 ; 125.4 ± 6.2 vs 160.4 ± 9.5 ; and 101 ± 5.8 vs 120.4 ± 8.2 , respectively, all $P < 0.01$), whereas the levels of bcl-2 protein increased dramatically (13.34 ± 4.12 vs 6.72 ± 2.59 ; 14.96 ± 4.85 vs 8.24 ± 3.13 ; 15.29 ± 5.28 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 5.96 ± 1.93 ; 11.08 ± 4.83 vs 6.87 ± 2.43 , respectively, all $P < 0.01$). Pathological injuries were seen to have been alleviated.

CONCLUSION: Enteral administration of propofol reduces apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion injury.

Key Words: Ischemia-reperfusion; Propofol; Epithelial cells; Apoptosis; TdT-mediated d-UTP-biotin nick end-labeling

Zhao JY, Hao JH, Li P, Guo H. Effects of propofol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2786-2789

摘要

目的: 研究缺血再灌流时异丙酚对肠上皮细胞凋亡的影响及可能机制。

方法: 96只成年♂Wistar大鼠, 随机分为假手术组、缺血再灌流+生理盐水组(I/R+NS)和I/R+异丙酚组(I/R+Pr)。采用夹闭肠系膜上动脉(SMA)的方法制作肠缺血再灌流模型。以上各组分别在再灌流后0, 30, 60, 120和240 min(每时间点8只)处死动物取肠袋组织。采用病理学方法观察肠上皮细胞损伤指数; 原位DNA末端标记法(TUNEL)检测肠上皮细胞凋亡率的变化; 免疫组化法检测肠上皮细胞Caspase-3, bcl-2表达的变化。

结果: I/R+Pr组与I/R+NS组相比, 肠上皮细胞病理变化较轻, 肠上皮细胞的凋亡率明显下降($P < 0.01$), 再灌流后0, 30, 60, 120和240 min肠上皮细胞中Caspase-3阳性细胞数明显

减少(104.4 ± 5.3 vs 146.4 ± 7.6 ; 97.4 ± 6.2 vs 130.4 ± 7.4 ; 134.4 ± 5.1 vs 170.4 ± 8.1 ; 125.4 ± 6.2 vs 160.4 ± 9.5 ; 101 ± 5.8 vs 120.4 ± 8.2 , 均 $P < 0.01$), 而bcl-2阳性细胞数明显增加(13.34 ± 4.12 vs 6.72 ± 2.59 ; 14.96 ± 4.85 vs 8.24 ± 3.13 ; 15.29 ± 5.28 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 5.96 ± 1.93 ; 11.08 ± 4.83 vs 6.87 ± 2.43 , 均 $P < 0.01$).

结论: 异丙酚能抑制缺血再灌流时肠上皮细胞Caspase-3表达, 而增加bcl-2表达, 减少肠上皮细胞的凋亡.

关键词: 缺血-再灌流; 异丙酚; 肠上皮细胞; 凋亡; 原位DNA末端标记法

赵京禹, 郝建华, 李平, 郭徽. 肠缺血灌流时异丙酚对肠上皮细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2786-2789
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2786.asp>

0 引言

以往认为肠上皮细胞坏死是造成肠黏膜结构破坏, 屏障功能受损的细胞学基础, 但近来研究表明, 肠道缺血再灌流损伤细胞凋亡是肠上皮细胞死亡的主要形式^[1-2]. 我们旨在通过大鼠肠缺血再灌流模型, 观察异丙酚对缺血再灌流时小肠上皮细胞凋亡率、凋亡相关基因Caspase-3、bcl-2的表达及病理形态学的影响, 探讨异丙酚对肠上皮细胞凋亡的作用及可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠96只, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 体质量230-250 g. TUNEL试剂盒(德国宝灵曼公司), 采用Power Vision TM两步法进行免疫组织化学检测试剂盒(北京天来生物医学科技公司), 其他试剂均为分析纯. 异丙酚(山东正大福瑞达制药有限公司).

1.2 方法

1.2.1 动物模型分组 实验前适应性饲养1 wk, 术前12 h禁食, 自由饮水. 巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg), 麻醉成功后, 仰卧固定于手术台上, 常规备皮消毒铺无菌洞巾. 取腹部正中切口长约3-4 cm, 将肠管外置并覆盖温盐水纱布, 外用烤灯加温, 保持肠管的湿润和温度. 在距离十二指肠悬韧带后10 cm和18 cm处, 分别用两根一号丝线结扎肠管, 造成长约8 cm肠袋. 无损伤动脉夹夹闭异丙酚, SMA起始部, 阻断SMA血流45 min后, 松夹恢复肠系膜血流, 制成肠缺血再灌流模型. 动物

随机分为缺血再灌流+生理盐水组(I/R+NS组)、缺血再灌流+异丙酚组(I/R+Pr组)和假手术组. I/R+Pr组阻断SMA血流45 min后肠袋内注射异丙酚(0.1 mg/kg), I/R+NS组注射等体积生理盐水. 假手术组行上述操作, 而未夹闭SMA. 以上各组分别在再灌流后0, 30, 60, 120和240 min(每时间点8只)处死动物取肠袋组织. 冲洗后用40 g/L的甲醛溶液固定48 h, 脱水, 常规石蜡包埋, 切片.

1.2.2 苏木素-伊红染色 石蜡切片常规脱蜡至水后, 进行HE染色, 用于光镜下观察病理变化和肠上皮损伤. 每份切片在400倍光镜下随机选择10个视野由病理医师观察, 根据Chiu's^[4]评分方法进行肠上皮损伤测定.

1.2.3 肠黏膜上皮细胞凋亡检测 应用TUNEL法进行细胞凋亡的检测, 在末端脱氧核苷酸转移酶介导下, 使生物素标记的脱氧尿苷三磷酸(dUTP)掺合在凋亡细胞DNA片段的3-OH末端, 利用标记过氧化物酶的链霉抗生物素蛋白与生物素的特异结合, 加入底物, 通过DAB染色, 在显微镜下凋亡细胞核呈棕黄色. 连续观察10个绒毛、隐窝的高倍视野, 以平均每100个细胞含凋亡细胞个数为凋亡指数(AI).

1.2.4 Caspase-3和bcl-2在凋亡细胞中表达的检测 对凋亡细胞采用Power Vision TM两步法进行免疫组织化学双染检测, 操作按说明书进行. 石蜡切片常规脱蜡至水, 经过氧化氢处理后, 进行酶修复, 然后用1:100稀释的抗体, 4℃过夜孵育, DAB显色, 甲基绿复染, 常规脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察. 以PBS代替一抗作为阴性对照. 在同一放大倍数下观察, 细胞浆棕色者为阳性, 每个时相点随机取10个视野(400×)进行计数, 计算阳性细胞数.

统计学处理 数据均以均数±标准差(mean±SD)表示, 用SPSS11.0软件进行t检验.

2 结果

2.1 光镜下病理改变 正常组肠上皮细胞呈柱状, 刷状缘清晰, 排列整齐. 对照组从再灌流开始时肠上皮细胞略有肿胀, 再灌流时间延长, 肠上皮细胞肿胀逐渐加重, 并出现坏死, 脱落. 黏膜层炎症细胞浸润, 固有层红细胞增多. 治疗组损伤变化趋势同对照组, 但病变程度明显减轻.

2.2 TUNEL染色结果 TUNEL标记阳性染色为棕褐色, 主要位于胞核. 检测表明缺血再灌流组各时间点凋亡指数明显高于假手术组($P < 0.01$),

■创新盘点

外科手术中选用适当的麻醉剂非常重要, 本文通过观察异丙酚对肠缺血再灌流时的上皮细胞凋亡基因及病理变化的影响, 发现异丙酚能抑制缺血再灌流时肠上皮细胞Caspase-3的表达等, 设计恰当简单, 思路较新颖.

■同行评价

本文观察了异丙酚对肠缺血再灌注时上皮细胞凋亡基因及病理变化的影响,设计简单,层次分明,对基础研究和临床研究有一定的参考意义。

表 1 缺血再灌注期间Caspase-3和bcl-2阳性细胞数变化(mean ± SD)

分组	再灌注时间				
	0 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Caspase-3					
假手术组	57.4 ± 4.7	54.9 ± 4.9	55.9 ± 4.4	58.4 ± 3.4	55.4 ± 4.8
I/R+NS组	146.4 ± 7.6 ^b	130.4 ± 7.4 ^b	170.4 ± 8.1 ^b	160.4 ± 9.5 ^b	120.4 ± 8.2 ^b
I/R+Pr组	104.4 ± 5.3 ^d	97.4 ± 6.2 ^d	134.4 ± 5.1 ^d	125.4 ± 6.2 ^d	101 ± 5.8 ^d
bcl-2					
假手术组	18.51 ± 7.73	19.92 ± 8.01	18.74 ± 7.39	20.15 ± 6.85	18.27 ± 7.29
I/R+NS组	6.72 ± 2.59 ^b	8.24 ± 3.13 ^b	9.63 ± 2.89 ^b	5.96 ± 1.93 ^b	6.87 ± 2.43 ^b
I/R+Pr组	13.34 ± 4.12 ^{bd}	14.96 ± 4.85 ^{bd}	15.29 ± 5.28 ^{bd}	10.39 ± 3.61 ^{bd}	11.08 ± 4.83 ^{bd}

^b*P* < 0.01 vs 假手术组; ^d*P* < 0.01 vs I/R+NS组。

治疗组时间点凋亡指数明显低于缺血再灌注组 (*P* < 0.01), 但比假手术组高 (*P* < 0.01, 图1)。

2.3 Caspase-3和bcl-2表达 Caspase-3和bcl-2阳性染色为胞质黄染。Caspase-3的表达在I/R组远高于假手术组 (*P* < 0.01), 治疗组的表达明显低于I/R组 (*P* < 0.01, 表1)。bcl-2在I/R组的表达较假手术组低 (*P* < 0.01), 治疗组的表达远高于I/R组 (*P* < 0.01, 表1)。

3 讨论

肠道既是创伤、休克后损伤发生的靶器官, 又是SIRS的“启动器官”, 肠黏膜缺血再灌注损伤是最终导致MODS的重要病因学基础及中心环节^[3-5]。休克、创伤及复苏过程中脏器尤其是肠道的缺血再灌注损伤的防治已成为相关学科研究的热点和难点。新近研究表明在小肠的缺血再灌注损伤发生时除坏死外, 还存在另一种细胞死亡形式—细胞凋亡, 而且证实凋亡是肠黏膜上皮细胞死亡的主要方式, 占死亡细胞总数的80%^[6]。

异丙酚是一种新型静脉麻醉药, 除了麻醉作用外, 现认为对缺血再灌注损伤有较强的保护作用。首先异丙酚可减少自由基的生成和维持细胞膜及线粒体功能稳定等作用, 对缺血/再灌注损伤具有保护作用^[7]。在化学结构上与内源性抗氧化剂维生素E和已知的抗氧化剂丁化羟基甲苯十分相似。其抗氧化作用的结构基础也正是这种类似的酚羟基结构。异丙酚可直接与自由基反应, 生成2, 6-二异丙基苯氧基团, 同时使自由基灭活。其次, 异丙酚能抑制细胞因子的产生和释放。大量研究证明, 异丙酚能够影响TNF-α的产生和释放, 且在低浓度时便有较强

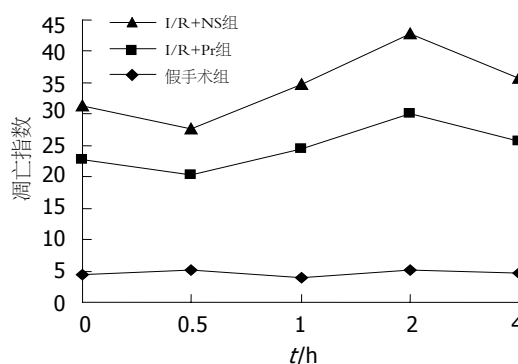


图 1 凋亡指数的变化。

的抑制作用^[8]。另外, 异丙酚能抑制细胞内钙离子浓度。有研究表明异丙酚对心肌细胞钙离子通道有抑制作用, 降低细胞内钙超载。目前, 肠缺血再灌注损伤细胞凋亡的具体发生机制尚未完全阐明。缺血再灌注损伤引起肠上皮细胞凋亡的发生可能包括以下机制: 氧自由基直接损伤DNA或攻击蛋白质使许多具有酶活性的蛋白质功能丧失而诱导细胞凋亡; 缺血再灌注期间多种因素造成细胞内钙离子超载而导致细胞凋亡; 受损的小肠上皮细胞及内皮细胞释放细胞因子和炎症介质, 同时加重炎症反应和细胞凋亡; 缺血再灌注期间线粒体功能改变而诱导凋亡的发生。进一步研究证实, 细胞凋亡的发生主要受凋亡相关基因和酶的调控, 这些基因和酶包括起诱导作用的如Caspase家族的酶类、P53等与起抑制作用的如bcl-2等, 这些促调因素和抑调因素相互作用, 决定了凋亡的启动和抑制。其中Caspase为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteine-requiring aspartate protease, Caspase)家族成员, 被认为是各种凋亡刺激因子激活的Caspase家族中的关键酶, 活化的Caspase-3可作

用于一些其他Caspase成员而产生瀑布式级联反应,引起细胞形态上的改变,使凋亡最终得以完成^[9-10];同时,Caspase-3直接酶解bcl-2片段使其功能发生根本转变,使后者从抑制凋亡转为触发凋亡.本实验观察到大鼠肠缺血再灌流期间肠黏膜组织Caspase-3表达在缺血再灌流组明显升高,而在治疗组其表达显著降低,Caspase-3阳性表达与TUNEL染色结果基本一致;且治疗组肠黏膜病理损伤明显减轻,提示缺血再灌流时肠黏膜上皮细胞凋亡的发生与促凋亡因素的增强有关.异丙酚能通过抑制促凋亡基因Caspase-3表达,从而抑制缺血再灌流期间肠黏膜上皮细胞凋亡的发生,防治缺血再灌流期间肠黏膜的损伤.本实验结果表明,bcl-2的表达在I/R组降低,而I/R+Pr组bcl-2表达较I/R组显著增高,且I/R+Pr组肠黏膜病理损伤明显减轻,提示缺血再灌流时肠黏膜上皮细胞凋亡的发生与促凋亡因素的增强和抑凋亡因素的减弱有关,异丙酚可能通过抑制促凋亡基因Caspase-3表达同时增加抑凋亡基因bcl-2的表达,从而抑制缺血再灌流期间肠黏膜上皮细胞凋亡的发生,防治缺血再灌流期间肠黏膜的损伤.此外,bcl-2表达与Caspase-3表达的反向趋势变化现象,亦可能与一定量的bcl-2蛋白被Caspase-3酶解有关.

我们的研究表明,肠缺血再灌流损伤期间,Caspase-3高水平表达和bcl-2降低可能是肠黏膜上皮细胞发生异常凋亡的重要机制;而异丙酚通过下调Caspase-3和上调bcl-2表达,从而抑制肠黏膜缺血再灌流时肠黏膜上皮细胞的异常凋亡,减轻肠黏膜缺血再灌流损伤.但异丙酚对

Caspase-3和bcl-2的具体调控机制,有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2029-2032
- 2 Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006; 11: 520-528
- 3 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 475-485
- 4 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421
- 5 胡森, 姜小国, 石德光, 吕艺, 黎君友, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响. 中国危重病急救医学 2003; 15: 748-750
- 6 Yoo KY, Yang SY, Lee J, Im WM, Jeong CY, Chung SS, Kwak SH. Intracoronary propofol attenuates myocardial but not coronary endothelial dysfunction after brief ischaemia and reperfusion in dogs. *Br J Anaesth* 1999; 82: 90-96
- 7 Gilliland HE, Armstrong MA, Carabine U, McMurray TJ. The choice of anesthetic maintenance technique influences the antiinflammatory cytokine response to abdominal surgery. *Anesth Analg* 1997; 85: 1394-1398
- 8 Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998; 42: 530-537
- 9 Wang JX, Zheng S. Caspase-3 and survivin expression in pediatric neuroblastoma and their roles in apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1821-1824
- 10 Zhan Y, van de Water B, Wang Y, Stevens JL. The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. *Oncogene* 1999; 18: 6505-6512

编辑 王晓瑜 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定:○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.