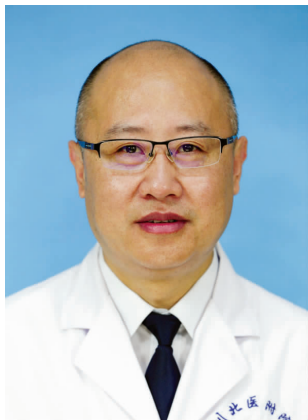


doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.09.027

◆ 校庆约稿 ◆



陈斌

专家简介

陈斌(1967-),男,硕士,主任医师,硕士研究生导师。川北医学院肝胆胰研究所副所长,附属医院国有资产管理部部长。1992年毕业于川北医学院。中国医师协会麻醉分会委员,四川省麻醉医师分会副会长,四川省卫健委学术与技术带头人,四川省继续医学教育委员会专家组成员。主要从事麻醉与器官保护研究,参加国家自然科学基金课题3项,负责省、厅及市级科研项目5项,以通讯作者和第一作者在国内外发表论著、论文30余篇,获得四川省医学科技奖“一等奖”、南充市科技进步“三等奖”各1项。

丙泊酚对大鼠肠缺血-再灌注炎症反应的影响

陈思言,欧刚,陈斌

(川北医学院附属医院麻醉科,四川南充 637000)

【摘要】目的:探讨丙泊酚对大鼠肠缺血-再灌注炎症反应的影响。**方法:**健康雄性SPF级SD大鼠40只,每组10只。采用夹闭肠系膜上动脉(SMA)1h再灌注2h方法制作肠缺血-再灌注损伤模型,随机分为假手术组(S组)、肠缺血-再灌注组(I/R组)、丙泊酚预处理组(P组)和生理盐水预处理组(NS组)。苏木素/伊红(HE)染色观察结肠组织的形态改变和病理损伤评分,酶联免疫吸附(ELISA)实验检测结肠组织白细胞介素-1(IL-1)、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达水平。**结果:**与S组比较,I/R组和NS组结肠组织损伤评分及IL-1、IL-6、TNF- α 含量均增高($P < 0.05$)。与I/R组比较,P组结肠组织损伤评分及IL-1、IL-6、TNF- α 含量均降低($P < 0.05$)。**结论:**丙泊酚腹腔注射预处理可以通过降低大鼠肠缺血-再灌注损伤程度及炎症反应。

【关键词】缺血再灌注;丙泊酚;结肠;炎症反应;大鼠

【中图分类号】 R614 **【文献标志码】** A

Effect of propofol on inflammatory response of intestinal ischemia reperfusion in rats

CHEN Si-yan, OU Gang, CHEN Bin

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of propofol on intestinal ischemia reperfusion inflammation in rats. **Methods:** 40 healthy male SPF-grade SD rats were randomly divided into a sham operation group (group S), an intestinal ischemia reperfusion group (group I/R), a propofol pretreatment group (group P) and a normal saline pretreatment group (group NS), 10 rats in each group. A model of ischemia-reperfusion injury was made by clamping the superior mesenteric artery (SMA) for 1 h and reperfusion for 2 h. Colon tissue was removed and stained with Hematoxylin/eosin (HE). Morphological changes of colon tissue were observed under light microscope, and pathological changes of colon tissue was performed. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test was used to detect colon tissue interleukin-1 (IL-1), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results:** Compared with group S, the score of colon tissue injury in group I/R and group NS was significantly increased ($P < 0.05$), and contents of IL-1, IL-6 and TNF- α were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with group I/R, the score of colon tissue injury in group P was decreased significantly ($P < 0.05$), and the contents of IL-1, IL-6 and TNF- α were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Propofol pretreatment by intraperitoneal injection can reduce intestinal ischemia-reperfusion injury by reducing the contents of IL-1, IL-6 and TNF- α in colon tissue.

【Key words】 Ischemia-reperfusion; Propofol; Colon; Inflammatory response; Rat

作者简介: 陈思言(1995-),女,硕士研究生。E-mail:765630452@qq.com

通讯作者: 陈斌。E-mail:154024348@qq.com

腹部外伤、失血性休克、严重创伤、感染、烧伤可发生肠缺血-再灌注 (ischemia reperfusion injury, IRI) 损伤^[1]。肠 IRI 不仅可以引起肠道组织局部损害,还可以导致细菌和毒素移位到体循环,产生异常的组织反应,促炎症细胞因子大量释放入血,引发系统性炎症反应综合征,后期可发展为多器官功能衰竭^[2]。因此,目前缺血-再灌注损伤的机制,以及如何减轻 IRI 产生的炎症反应、氧化应激损伤一直是研究热点。在肠缺血-再灌注损伤中炎症细胞因子发挥了重要作用,在肠道组织发生缺血再灌注后,细胞会释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 (IL-1) 及 IL-6 等炎症细胞因子,对受损的细胞组织产生损伤。IL-1 和 IL-6 都具有多种致炎活性,包括白细胞趋化、吞噬细胞刺激、增强下游细胞因子和趋化因子的产生。TNF- α 可提高中性粒细胞的吞噬能力,也能促进内皮细胞对 IL-1、IL-6 的分泌,并能促进中性粒细胞和内皮细胞的黏附作用,从而刺激扩大机体局部炎症反应及组织的损伤^[3]。因此,炎症因子在缺血-再灌注过程中的表达水平来反映炎症反应的强烈程度,同时也反映出缺血-再灌注损伤的严重程度。丙泊酚具有麻醉诱导快和恢复迅速的特点,是外科手术麻醉的基本药物。丙泊酚的化学结构与天然抗氧化剂维生素 E 的结构类似,能抑制氧自由基的产生或拮抗其氧化效应,对缺血-再灌注损伤有预防或治疗作用^[4],但丙泊酚对肠缺血-再灌注的炎症反应有何影响,尚未见临床报道。本研究拟构建大鼠肠缺血-再灌注损伤模型,使用丙泊酚预处理,观察对肠组织病理形态学改变,Chiu 氏评分^[5]及对 IL-1、IL-6、TNF- α 含量的影响,探讨丙泊酚是否对大鼠肠缺血-再灌注损伤有预防或治疗作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只,体重 (220 \pm 30)g,购于川北医学院动物实验中心。术前禁食 12 h,自由饮水。本研究已通过川北医学院伦理委员会审查,批号为 NSMC 伦理动物审[2021]01 号。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型创建 参考 Wang 等^[6]的实验方法建立肠 IRI 模型。术前大鼠禁食 12 h,自由饮水,给予 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射麻醉,待麻醉生效后,将大鼠仰卧位固定于解剖板上,常规手术区域消毒铺巾,取腹正中切口 2.0 ~ 3.0 cm,用 37 $^{\circ}$ C 左右无菌生理盐水纱布保护切口,分离肠系膜动脉,以无创微动脉夹夹闭肠系膜动脉 (SMA) 根部,可见肠系膜动脉搏动消失,结肠组织颜色由鲜红

变苍白,表明 SMA 成功阻断,缝合切口,1h 后原切口进腹,移走动脉夹,恢复血流实施再灌注,肉眼可见肠系膜动脉搏动恢复,结肠组织颜色由暗红变为鲜红。术中用白炽灯加热保温,维持直肠温度 36 ~ 38 $^{\circ}$ C,每隔 30 min 观察大鼠结肠组织血供情况。

1.2.2 实验分组 采用随机数字表法,将 40 只大鼠随机分为假手术组 (S 组)、肠 I/R 损伤 (I/R 组)、丙泊酚预处理组 (P 组) 和 NS 预处理组 (NS 组),每组各 10 只。S 组和 I/R 组实验开始前连续 3 d 腹腔既不注射丙泊酚也不注射生理盐水,实验开始时,S 组仅分离肠系膜上动脉而不夹闭,I/R 组分离肠系膜上动脉后夹闭 1 h,再灌注 2 h;P 组于实验前每天 18:00 点腹腔注射丙泊酚 50 mg/kg,连续 3 d;实验开始时分离肠系膜上动脉夹闭 1 h,再灌注 2 h;NS 组于实验前同一时间点腹腔注射等容积 0.9% 生理盐水,实验开始时操作同 P 组。

1.2.3 标本处理 恢复正常血液灌注 2 h 时处死大鼠,打开腹腔,迅速取出升结肠组织,用装有 4 $^{\circ}$ C 生理盐水的注射器冲洗肠道内容物,然后纵向剖开肠道,滤纸吸干水分,切 3 mm 组织进行组织学分析,把肠道卷成瑞士卷样,然后放入活检盒中维持瑞士卷状浸泡入多聚甲醛,其余部分置于 -196 $^{\circ}$ C 液氮中保存,检测 IL-1、IL-6、TNF- α 表达水平。

1.2.4 结肠黏膜形态学观察和病理学分析 实验大鼠结肠组织用多聚甲醛溶液固定 24 h,而后经乙醇梯度脱水 (70%、80%、90%、95%、100%),二甲苯透明,石蜡包埋,做成蜡块,用石蜡切片机将包埋好的蜡块切成厚度 5 μ m 连续切片,烤片后进行苏木素/伊红染色,显微镜下观察结肠组织病理学改变情况。每个标本取 2 个不同切片,每个切片取 10 个视野取均数 (100 \times)。采用 Chiu 氏评分法^[5]评价肠黏膜损伤程度,0 分为正常绒毛;1 分为绒毛顶端黏膜下出现间隙,毛细血管充血;2 分为黏膜下间隙扩大,肠黏膜与黏膜下层分离;3 分为黏膜与黏膜下层分离延伸到肠绒毛两侧;4 分为绒毛变钝,固有层及其血管暴露,炎症组织浸润;5 分为固有层消化崩解,出血或形成溃疡;分值越高表示组织病变越严重。

1.2.5 炎症细胞因子检测 取约 100 mg 结肠组织,加入 0.9 mL 生理盐水制成 10% 的组织匀浆,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 按试剂盒 (江苏酶联生物科技提供) 说明书,检测结肠组织中 TNF- α 、IL-1、IL-6 含量。用纯化的抗体包被微孔板,制成固相抗体,向包被抗体的微孔中依次加入抗原、生物素化的抗大鼠抗体、亲和素过氧化物酶复合物 (ABC),经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色液显色。TMB 在过

氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中炎症因子含量呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值,计算样品浓度。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析与处理。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA);不符合正态分布的计数资料以中位数表示,采用 Kruskal wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠结肠组织切片及病理评分比较

光镜下:S组肠黏膜绒毛完整光滑,皮下间隙无扩张、无充血、水肿,未见或极少量炎症细胞浸润;I/R组和NS组肠黏膜绒毛排列不规则,黏膜及黏膜下水肿、出血,炎症细胞渗出;P组肠黏膜充血,间质出血较I/R组轻,黏膜缺损、断裂现象较I/R组有明显改善,腺体结构比较清楚。Chiu氏评分结果显示,I/R组和NS组Chiu氏评分高于S组($P < 0.05$),P组高于S组($P < 0.05$),但低于I/R组和NS组($P < 0.05$)。见图1及表1。

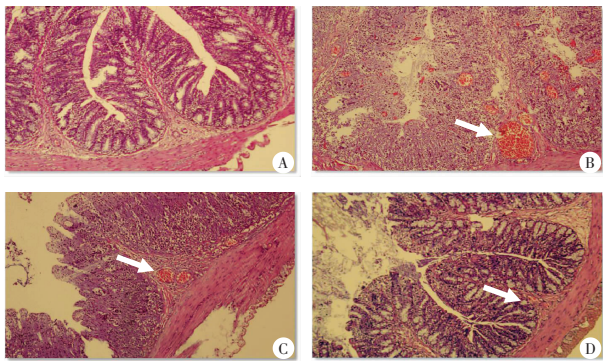


图1 各组大鼠结肠 HE 染色

A. S组黏膜绒毛完整光滑,无充血、水肿;B. I/R组黏膜水肿、出血,炎症细胞渗出;C. NS组黏膜水肿、出血,炎症细胞渗出;D. P组黏膜充血,间质出血较I/R组轻,腺体结构比较清楚。

表1 各组大鼠结肠 Chiu氏评分比较($\bar{x} \pm s$)

	S组(n=10)	I/R组(n=10)	NS组(n=10)	P组(n=10)
Chiu氏评分	0.80±0.789	3.90±0.876*	4.00±0.816*	3.00±0.667#

* $P < 0.05$,与S组相比;# $P < 0.05$,与I/R组相比。

2.2 结肠组织炎症因子含量比较

与S组相比,I/R组和NS组大鼠结肠组织IL-1、IL-6和TNF- α 的表达升高($P < 0.05$);经丙泊酚干预后,P组大鼠结肠组织IL-1、IL-6和TNF- α 的表达均下降,且与I/R组和NS组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 组织炎症因子检测结果比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

指标	S组(n=10)	I/R组(n=10)	NS组(n=10)	P组(n=10)
IL-1	10.28±0.69	40.45±1.30*	41.09±1.25*	37.61±1.66#
IL-6	11.09±0.73	41.41±1.45*	41.90±0.99*	40.11±1.13#
TNF- α	55.71±3.33	161.76±5.66*	163.88±5.39*	128.92±4.36#

* $P < 0.05$,与S组相比;# $P < 0.05$ 与I/R组相比。

3 讨论

本研究通过采用夹闭肠系膜动脉法构建大鼠结肠I/R模型,光镜下可见,I/R组大鼠结肠组织发生明显的I/R损伤(图1),且Chiu氏病理学损伤评分亦高于S组及NS组($P < 0.05$),与Kalogeris等^[7]的研究相符,证实造模成功。本研究发现,丙泊酚干预I/R模型大鼠经丙泊酚干预后的P组大鼠结肠组织肉眼和光镜下显示肠壁外观、黏膜缺损/断裂、间质充血和炎症细胞浸润等病理预后变化较I/R组有明显改善,且Chiu氏评分也低于I/R组($P < 0.05$),提示丙泊酚能够有效降低结肠I/R病理损伤。可能的机制^[8-14]有:(1)降低炎症因子以及髓过氧化物酶MPO的表达;(2)抑制NADPH氧化酶介导的肥大细胞激活;(3)抑制ROS的过量产生、内质网Ca²⁺的释放以及线粒体去极化减轻脑缺血再灌注损伤,保护神经系统功能;(4)阻止HIF-1 α 激活来抑制线粒体功能障碍和氧化应激;(5)BRG-1介导的Nrf/HO-1转录因子的激活,减轻组织羟自由基和超氧阴离子的含量;(7)通过激活Nrf-2通路减轻组织脂质过氧化物丙二醛的积累,提高超氧化物歧化酶(SOD)的活力。

Ayazi等^[15]研究指出,IL-1、IL-6、TNF- α 为主要的促炎因子,其在血液循环和局部组织中的过度激活可诱发大量炎症介质释放,降低机体免疫功能,引起强烈的全身性和局部性炎症反应。本研究发现,与S组比较,I/R组和NS组IL-1、IL-6、TNF- α 含量升高($P < 0.05$),故可认为本研究设计的观察指标是合理的。经丙泊酚干预后,P组大鼠结肠组织IL-1、IL-6和TNF- α 的含量较I/R组均降低($P < 0.05$),提示丙泊酚预处理可以通过降低结肠组织IL-1、IL-6和TNF- α 含量来减轻大鼠肠缺血再灌注损伤。Idriss等^[16]研究也指出,TNF- α 是肠缺血再灌注损伤中释放最早、发挥核心作用的一种内源性炎症介质,通过作用于细胞膜上的可溶性受体(TNFR1与TNFR2),激活凋亡蛋白caspase-8诱导细胞凋亡,NF- κ B与相应的DNA启动子区域结合可促进促炎细胞因子。由此我们可推测丙泊酚是否是通过阻止NF- κ B与相应的DNA启动子区域的结合来抑

制促炎因子的释放,这还需要进一步的实验验证。Fatemeh 等^[17]研究证明 5-HT_{1B/1D} 受体参与大鼠肠缺血再灌注炎症反应和氧化应激,我们也可以进一步推测丙泊酚是否能够作用于 5-HT_{1B/1D} 受体。本研究不足之处在于:(1)未研究不同剂量丙泊酚预处理对大鼠结肠缺血再灌注的影响;(2)未证实丙泊酚腹腔注射是否是最佳药物处理方式;(3)未能观察丙泊酚预处理后大鼠的存活率,以更加有利地说明丙泊酚预处理的有效性。丙泊酚对保护肠 I/R 损伤作用的其他机制,需要进一步的研究与探索。

综上,丙泊酚腹腔注射预处理能够减轻大鼠结肠 I/R 病理损伤,同时抑制肠 I/R 的炎症反应。

参考文献

- [1] Gubernatorova EO, Perez-Chanona E, Koroleva EP, *et al.* Murine model of intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *J Vis Exp*, 2016, 111:53881.
- [2] Ypsilantis P, Lambropoulou M, Tentes I, *et al.* Mesna protects intestinal mucosa from ischemia/reperfusion injury [J]. *J Surg Res*, 2006, 134(2):278-284.
- [3] Shih YM, Shih JM, Pai MH, *et al.* Glutamine Administration After Sublethal Lower Limb Ischemia Reduces Inflammatory Reaction and Offers Organ Protection in Ischemia/Reperfusion Injury [J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2016, 40(8):1122-1130.
- [4] 郭曲练,姚尚龙. 临床麻醉学 [M]. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2016:90.
- [5] 李青文,谢景远,崔珊珊,等. PI3K/Akt 信号通路在丙泊酚减轻大鼠肠缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2019(3):319-322.
- [6] Wang S, Xie T, Sun S, *et al.* DNase-I treatment exerts protective effects in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):17788.
- [7] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, *et al.* Ischemia/Reperfusion [J]. *Compr Physiol*, 2016, 7(1):113-170.
- [8] Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, *et al.* Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2018, 63(1):26-32.
- [9] Gan X, Xing D, Su G, *et al.* Propofol attenuates small intestinal ischemia reperfusion injury through inhibiting NADPH oxidase mediated mast cell activation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, Doi: 10.1155/2015/167014.
- [10] Zhong H, Song R, Pang Q, *et al.* Propofol inhibits parthanatos via ROS-ER-calcium-mitochondria signal pathway in vivo and vitro [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10):932.
- [11] Li Y, Zhong D, Lei L, *et al.* Propofol prevents renal ischemia-reperfusion injury via inhibiting the oxidative stress pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(1):14-26.
- [12] Bellanti F, Mirabella L, Mitarotonda D, *et al.* Propofol but not sevoflurane prevents mitochondrial dysfunction and oxidative stress by limiting HIF-1alpha activation in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 96:323-333.
- [13] Ge M, Yao W, Wang Y, *et al.* Propofol alleviates liver oxidative stress via activating Nrf2 pathway [J]. *J Surg Res*, 2015, 196(2):373-381.
- [14] Yao W, Luo G, Zhu G, *et al.* Propofol activation of the Nrf2 pathway is associated with amelioration of acute lung injury in a rat liver transplantation model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, Doi: 10.1155/2014/258567.
- [15] Ayazi P, Mahyar A, Daneshi MM, *et al.* Comparison of serum IL-1beta and c reactive protein levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis [J]. *Infez Med*, 2014, 22(4):296-301.
- [16] Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) [J]. *Microsc Res Tech*, 2000, 50(3):184-195.
- [17] Fatemeh G, Alireza A, Hamed S, *et al.* Involvement of 5-HT_{1B/1D} receptors in the inflammatory response and oxidative stress in intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 882:173265.