

丙泊酚对内毒素诱导人单核细胞释放细胞因子和表达 SOD1 蛋白的影响

孙艺娟, 黄希照, 胡祖荣, 杨世辉, 罗 辉, 宋匀韵
(广东省妇女儿童医院麻醉科, 广东 广州 510010)

【摘要】 目的 观察丙泊酚对内毒素 (LPS) 诱导人单核细胞 (THP-1) 表达超氧化物歧化酶 (SOD1) 的影响及对细胞因子释放的影响。方法 将体外培养的人单核细胞 THP1 细胞分为四组: 正常对照组 (C 组)、LPS 刺激组 (L 组)、丙泊酚处理组 (P 组) 和丙泊酚预处理合并 LPS 刺激组 (P+L 组), 并用 Western blot 法检测各组内 SOD1 含量的变化。采用 ELISA 法检测四组不同处理因素对 THP1 细胞分泌 IL6、IL8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的影响。结果 在 LPS 刺激 12 h 后收集细胞, 与对照组比较 L 组中 SOD1 的表达量明显降低, IL6、IL8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 均明显增高 ($P < 0.01$); L+P 组中 SOD1 的表达量明显高于 L 组, IL6、IL8、TNF- α 均明显降低 ($P < 0.01$)。结论 体外 THP1 细胞培养下, 丙泊酚可以明显抑制 LPS 刺激 THP1 细胞 IL6、IL8、TNF- α 的大量释放和逆转 LPS 刺激下对 THP1 细胞内 SOD1 表达的抑制。

【关键词】 丙泊酚; THP1 细胞; LPS; SOD1; IL6; IL8; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)

【中图分类号】 R392.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)24-3592-03

Effect of propofol on secreting cytokines and SOD1 expression from human mononuclear macrophage cell induced by lipopolysaccharide. SUN Yi-juan, HUANG Xi-zhao, HU Zu-rong, YANG Shi-hui, LUO Hui, SONG Yun-yun. Department of Anesthesiology, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To explore the effect of propofol on secreting cytokines and SOD1 expression from human mononuclear macrophage cell induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** THP-1 cultured *in vitro* were

通讯作者: 孙艺娟。E-mail: 155221341@qq.com

肌的保护作用。与单纯手术组相比, 给药组心肌缺血损伤所致大鼠 CK-MB 的升高降低 ($P < 0.01$), 提示瓜蒌皮注射液能减轻心肌损伤, 减少心肌酶的释出, 增加梗死大鼠血清 NO 的含量, 并且可使给药组大鼠梗死周围缺血心肌 VEGF 的表达上调。该结果提示瓜蒌皮注射液对缺血心肌具有一定的缺血损伤保护作用, 其机理可能与上调 VEGF 的表达有关。VEGF 作用于内皮细胞上的受体, 激活 PI3K, 进一步使 PKB 磷酸化, 从而使内皮 NOS 激活, 促使精氨酸转变为瓜氨酸, 同时释放出 NO。NO 属于血管内皮衍生性舒张因子 (Endothelium derived relaxing factor, EDRF), 是心血管系统最重要的调节因子之一, 是血管生成必须的调节因子^[7], 具有许多生物学功能, 如调节内皮细胞的生长、凋亡、迁移, 调节冠脉循环和心肌功能, 扩张冠脉血管, 抑制血小板聚集和白细胞粘附, 参与高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发病过程。同时, VEGF 可促进血管内皮细胞分裂, 具有强大的促内皮细胞有丝分裂和血管新生的作用^[8]。

瓜蒌皮注射液能明显增加心肌损伤大鼠心肌 VEGF 和血清 NO 的含量, NO 可促进内皮细胞增殖、迁移、血管生成, 可以舒张冠脉, 增加冠脉血流, 改善循

环, 增强心肌功能, 减轻心肌缺血损伤。

参考文献

- [1] Kim CH, Cho YS, Chun YS, et al. Early expression of myocardial HIF-1 α in response to mechanical stresses [J]. Circulation research, 2002, 90: e25-e33.
- [2] Di Napoli P, Taccardi AA, De Caterina R, et al. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: experimental data [J]. 2002, Ital Heart J, 3(Suppl 4): 24S-28S.
- [3] Jones SP, Lefler DJ. Myocardial reperfusion injury: insights gained from gene-targeted mice [J]. News Physiol Sci, 2000, 15: 303-308.
- [4] 屠婕红, 余 菁, 陈伟光, 等. 瓜蒌的化学成分和药理作用研究概况 [J]. 中国药师杂志, 2004, 7(7): 562-563.
- [5] 王冬梅, 代世元, 芦丽莉, 等. 瓜蒌皮提取物对大鼠动脉粥样硬化保护作用的实验研究 [J]. 北华大学学报, 2008, 9: 128-131.
- [6] 吴 波, 曹 红, 陈思维, 等. 瓜蒌提取物对缺血缺氧及缺血后再灌注损伤心肌的保护作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17: 450-452.
- [7] Xia P, Aiello LP, Ishii H, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth [J]. J Clin Invest, 1996, 98: 2018-2026.
- [8] Ng YS, Krilleke D, Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis [J]. J. Experimental Cell Research, 2006, 312: 527-537.

(收稿日期: 2013-06-25)

randomly assigned into four groups: control group, LPS group, propofol group, LPS and pretreatment with propofol group. Western blot was applied to detect the expression of SOD1, and ELISA was used to detect cytokins secreted by THP1 cells stimulated with LPS. **Results** 12 h after stimulated by LPS, compared with the control group, the expression of SOD1 in LPS group decreased significantly, but cytokins (IL6, IL8, TNF- α) were higher ($P<0.01$). Compared with LPS group, the expression of SOD1 in LPS and pretreatment with propofol group was higher, but cytokins (IL6, IL8, TNF- α) decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** Propofol can increase the expression of SOD1, but decrease cytokins, and it may have some anti-peroxidation effects.

【Key words】 Propofol; THP1 cell; Lipopolysaccharide (LPS); SOD1; IL6; IL8; TNF- α

炎症反应是一种非特异性的免疫反应,脓毒血症是由致病菌及其产生的毒素所引起的一种炎症反应综合征^[1-2]。丙泊酚是一种静脉麻醉药,近年的研究发现丙泊酚具有抗炎、抗氧化、保护氧化应激损伤的细胞和组织的作用^[3]。Taniguchi 等^[4]研究证实给予丙泊酚可以显著降低内毒素休克动物体内促炎性因子的产生并降低动物死亡率。大量的实验证明丙泊酚作为一种氧自由基清除剂可以抑制脂质过氧化,调节抗氧化酶系统,增加组织和细胞的抗氧化能力^[5]。因此我们设计本研究,以人类单核白血病细胞 THP-1 细胞为效应细胞,经内毒素(LPS)诱导,观察丙泊酚对抗氧化蛋白 SOD1 表达的影响,并检测相关细胞因子以了解丙泊酚的抗炎抗氧化机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640 培养基购自美国 GibcoBRL 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司;丙泊酚购自英国阿斯利康医药公司;THP-1 细胞购自上海细胞生物所细胞库;LPS 购自美国 (*Escherichia coli* O11:B4)Sigma 公司;抗-SOD1 单克隆抗体购自 Abcam;二抗购自美国 Zymed Lab Inc 公司;辣根过氧化物酶化学发光液购自美国 Pierce 公司。IL-6、IL-8 试剂盒购自比利时 Innogenetics 公司,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒购自长春新华宇生物器材公司。

1.2 细胞培养及分组处理 THP-1 细胞培养收集分离的细胞,离心 10 min,弃上清,用含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养液混匀细胞,调整细胞密度至 $(1.1\sim 1.5)\times 10^6/\text{cm}^2$,种入培养皿,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养;次日换液,根据细胞生长情况每 2~3 d 换液。实验前 3 d 将细胞种入六孔板,实验前 6 h 更换为无血清的培养基,然后进行分组,每组取 9 个样本:(1)正常对照组(C组):不加任何刺激;(2)LPS 刺激组(L组):给予 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$;(3)丙泊酚处理组(P组):给予丙泊酚 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$;(4)丙泊酚预处理合并 LPS 刺激组(P+L组):给予丙泊酚 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$,1h 后再

给予 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。37℃、5% CO₂ 条件下培养 12 h 后收集细胞,取 20 μl THP-1 细胞至 EP 管中,加入 6 \times loading buffer 4 μl ,100℃煮 10 min,使蛋白质变性,室温下 10 000 g 离心 2 min。

1.3 免疫印迹检测目的蛋白的表达 在 12% 的浓缩胶中完成电泳,通过电转仪完成 PVDF 膜转膜。TBST 缓冲液(PH7.4, TBS 加入 0.1% Tween-20)洗膜和孵育抗体。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,按 1:200 浓度加入一抗,4℃封闭过夜, TBST 缓冲液漂洗三次,每次 5 min。用 1:5 000 浓度二抗室温下孵育 1 h, TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min,然后与发光剂反应 1 min,在 Kodak IS2000R 多功能图像工作站采集结果。

1.4 细胞因子含量检测 应用 ELISA 双抗体夹心法检测三组中 IL6、IL8、TNF- α 浓度水平。严格按说明书操作,由专人负责。于酶标仪 492 nm 处测量吸光度(A),根据各自标准质量浓度制定标准曲线,在标准曲线上查找相应的值。

1.5 统计学方法 所有数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析方法,组间多重比较用 LSD 法,方差不齐者用 Welch 法,多重比较用 Games-Howell 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,所有统计分析均由 SPSS13.0 统计软件包分析。

2 结果

在 LPS 刺激 12 h 后收集细胞,与对照组比较 L 组中 SOD1 的表达量明显降低($P<0.05$)(图 1、表 2), IL6、IL8、TNF- α 均明显增高($P<0.01$)(表 1); L+P 组中 SOD1 的表达量明显高于 L 组($P<0.05$)(图 1、表 2), IL6、IL8、TNF- α 均明显降低($P<0.01$),见表 1。

表 1 丙泊酚对 LPS 诱导 THP1 细胞释放细胞因子的影响($\bar{x}\pm s$, pg/ml, $n=9$)

组别	IL6	IL8	TNF- α
对照组	44.1 \pm 11.6	78.5 \pm 9.7	30.8 \pm 5.4
P 组	38.5 \pm 10.1	89.0 \pm 9.8	45.9 \pm 6.9
L 组	406.9 \pm 78.7 ^a	234.6 \pm 33.8 ^a	367.8 \pm 15.4 ^a
L+P 组	105.2 \pm 34.7 ^b	106.5 \pm 13.3 ^b	89.7 \pm 20.2 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与 L 组比较,^b $P<0.01$ 。

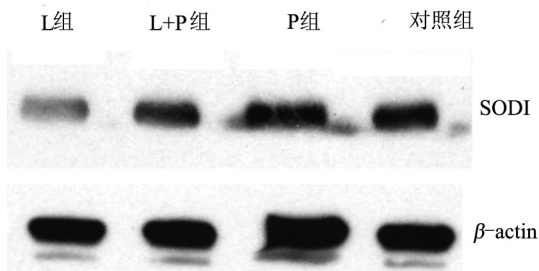


图 1 丙泊酚对 THP-1 细胞中 SOD1 表达的影响

表 2 SOD1 条带积分吸光度值($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	对照组	P 组	L 组	L+P 组
SOD1	50966±450	51004±508	10990±709 ^a	36009±708 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 L 组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

丙泊酚(Propofol)是一种新型的快时、短效静脉麻醉药。由于其具有苏醒迅速完全,持续输注后无蓄积等特点,被普遍应用于麻醉诱导、维持及麻醉中、手术后与 ICU 病房的镇静。除了常规的催眠、镇静与遗忘作用外,丙泊酚还具有抑制炎症反应的功能,且这方面的功能近年来越来越受到人们的重视。它的化学构成含有羟基酚,结构类似 Vitamin-E,因此具有潜在抗氧化能力^[6]。大量实验证明丙泊酚可以通过抑制 ROS/Akt/IKkb/NF-kB 信号通路减轻 LPS 引起的炎症反应^[7]。脓毒症所致全身炎症反应可产生大量氧自由基,并释放大量炎症因子,引起机体组织细胞损伤。革兰氏阴性杆菌外膜可产生内毒素,其主要化学成分 LPS 可以引起脓毒血症^[8]。LPS 可以通过多种细胞内信号转导通路刺激单核/巨嗜细胞、中性粒细胞和内皮细胞释放多种促炎细胞因子,特别是 IL6、IL8、TNF- α ,进一步引起次级炎症介质氧自由基和脂质因子的释放,从而引起细胞功能障碍和组织损伤^[9-11]。本研究通过培养人单核细胞 THP1 作为效应细胞,再用 LPS 刺激 THP1 细胞模拟氧化应激反应,发现丙泊酚可以明显抑制 IL6、IL8、TNF- α 的大量释放进而抑制炎症反应。

细胞内铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD, SOD)是一种广泛存在于生物体内的天然的氧自由基清除剂,能够清除超氧阴离子(O₂⁻)自由基等超氧化物,维持机体内氧化剂与抗氧化剂的动态平衡。人体内的 SOD 主要有三种:①SOD-1(Cu/Zn-SOD)主要存在于细胞质中,可以催化两个分子的 O₂ 发生歧化反应生成 H₂O₂ 和 O₂^[12];②SOD-2(Mn-SOD)主要存在于线粒体中;③SOD-3(EC-SOD)主要存在于细胞外基质和细胞表面上。SOD-1 是内皮细胞中主要形式的 SOD,在血管壁中发挥调节超氧阴离子水平、NO 生

物利用度及内皮功能、增加机体抗氧化能力、保护内皮细胞等功能^[13]。本研究通过蛋白质印迹法研究丙泊酚对抗氧化蛋白 SOD1 表达的影响,发现丙泊酚可以逆转 LPS 刺激下对 THP1 细胞内 SOD1 表达的抑制,进而发挥抗炎抗氧化作用,保护细胞功能。

综上所述,体外 THP1 细胞培养下,丙泊酚可以明显抑制 LPS 刺激 THP1 细胞 IL6、IL8、TNF- α 的大量释放和逆转 LPS 刺激下对 THP1 细胞内 SOD1 表达的抑制。

参考文献

- [1] Brunkhorst FM, Reinhart K. Diagnosis and causal treatment of sepsis [J]. Internist (Berl), 2009, 50: 810-816.
- [2] Barrientos-Vega R, Mar Sánchez-Soria M, Morales-García C, et al. Prolonged sedation of critically ill patients with midazolam or propofol: impact on weaning and costs [J]. Crit Care Med, 1997, 25: 33-40.
- [3] Takao Y, Mikawa K, Nishina K, et al. Attenuation of acute lung injury with propofol in endotoxemia [J]. Anesth Analg, 2005, 100: 810-816.
- [4] Taniguchi T, Kanakura H, Yamamoto K. Effects of posttreatment with propofol on mortality and cytokine responses to endotoxin induced shock in rats [J]. Crit Care Med, 2002, 30(4): 904.
- [5] Wu XJ, Zheng YJ, Cui YY, et al. Propofol attenuates oxidative stress-induced PC12 cell injury via p38 MAP kinase dependent pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28: 1123-1128.
- [6] Aarts L, van der Hee R, Dekker I, et al. The widely used anesthetic agent propofol can replace alpha-tocopherol as an antioxidant [J]. FEBS Lett, 1995, 357: 83-85.
- [7] Tang J, Chen X, Tu W, et al. Propofol inhibits the activation of p38 through up-regulating the expression of annexin A1 to exert its anti-inflammation effect [J]. PLoS One, 2011, 6: 27890.
- [8] Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction [J]. FASEB J, 1991, 5: 2652-2660.
- [9] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8: 776-787.
- [10] Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) [J]. J Am Coll Cardiol, 1996, 27: 1201-1206.
- [11] Carlson DL, Willis MS, White DJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced caspase activation mediates endotoxin-related cardiac dysfunction [J]. Crit Care Med, 2005, 33: 1021-1028.
- [12] Lesser MP. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology [J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 253-278.
- [13] Sinha I, Pearce CG, Cho BS, et al. Different regulation of the superoxide dismutase family in experimental aortic aneurysms and rat aortic explants [J]. J Surg Res, 2007, 138(2): 156-162.

(收稿日期:2013-07-09)