

## 丙泊酚通过诱导自噬保护血管紧张素 II 引起细胞损伤

胡 喆<sup>1,2</sup>, 梁就庆<sup>1</sup>, 王晶晶<sup>2</sup>, 张良清<sup>1,2</sup> (广东医科大学附属医院 1. 器官功能损伤与保护重点实验室; 2. 麻醉科, 广东湛江 524001)

**摘要:** 目的 探讨丙泊酚对血管紧张素II(Ang II)引起细胞损伤的保护机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs), 建立Ang II损伤模型; 实验分为正常对照组、Ang II组、Ang II+丙泊酚(Ang II+P)组、二甲基亚砜(DMSO)对照组、Ang 1-7抑制剂组。用CCK8检测细胞活性, 免疫荧光染色检测细胞色素C, 蛋白印迹法检测自噬相关蛋白LC3和P62表达。结果 Ang II最适宜作用浓度为 $10^{-6}$  mol/L, 丙泊酚保护作用最适宜浓度为100  $\mu$ mol/L。Ang II组和DMSO组线粒体释放细胞色素C高于Ang II+P组( $P<0.05$ ), 但其与Ang 1-7抑制剂组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。Ang II+P组P62表达水平略高于DMSO组, 且自噬相关蛋白LC3-I向LC3-II转化亦增多, 但差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 丙泊酚通过影响线粒体自噬途径抑制Ang II引起内皮细胞损伤。

**关键词:** 丙泊酚; 血管紧张素 II; 自噬

中图分类号: R 363

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)04-0333-05

## Propofol protects angiotensin II-induced cell injury by inducing autophagy

HU Zhe<sup>1,2</sup>, LIANG Jiu-qing<sup>1</sup>, WANG Jing-jing<sup>2</sup>, ZHANG Liang-qing<sup>1,2</sup> (1. Key Laboratory for Organ Injury and Protection; 2. Department of Anesthesiology; Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

**Abstract:** **Objective** To study the protective mechanism of propofol on angiotensin II (Ang II)-induced cell injury. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used to establish the Ang II-induced cell injury model, and divided into control (NC), Ang II, Ang II+propofol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and Ang 1-7 inhibitor groups. Cell viability, and expression cytochrome C and autophagy related proteins LC3 and P62 were detected by CCK8, immunofluorescence, and Western blot, respectively. **Results** The most effect concentrations of Ang II and propofol were  $10^{-6}$  mol/L and 100  $\mu$ mol/L, respectively. The mitochondrial cytochrome C level was higher in AngII and DMSO groups than in Ang II+propofol group ( $P<0.05$ ) but similar to that in Ang 1-7 inhibitor group ( $P>0.05$ ). P62 expression and conversion from LC3-I to LC3-II were mildly upregulated in Ang II+propofol group compared with DMSO group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Propofol can inhibit Ang II-induced endothelial injury through autophagy pathway.

**Key words:** Propofol; angiotensin II; autophagy

随着社会经济的发展、居民生活方式的变化、人口老龄化进程的加快等, 心血管病的发病率持续增加, 严重危害着人类健康, 已成为重大的公共卫生问题。研究发现, 血管紧张素 II (Ang II) 的浓度在高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生过程中显著升高<sup>[1]</sup>。有研究显示, Ang II可以直接导致血管内皮细胞凋亡<sup>[2]</sup>。在高浓度Ang II的刺激下, 血管内皮细胞中活性氧簇产生增加<sup>[3]</sup>, 进而影响线

粒体ATP敏感性钾通道产生并释放更多的活性氧簇, 造成细胞中氧化蛋白和受损线粒体的大量累积, 从而导致细胞自噬水平的改变, 严重影响了血管内皮细胞结构与功能的完整性, 与心血管疾病的发生、发展密切相关<sup>[4]</sup>。目前也有研究发现, 自噬的异常调节与血管内皮细胞的衰老和血管疾病的发病机制密切相关<sup>[5]</sup>。丙泊酚作为一种常用的静脉麻醉药物, 因具有起效快、持续时间短、苏醒迅速、不良反应少等优点而被广泛应用于临床麻醉等领域。丙泊酚的化学结构与内源性抗氧化剂 $\alpha$ -生育酚和抗氧化剂丁化羟基甲苯相似, 因此可以发挥抗氧化的生物学效应<sup>[6]</sup>。丙泊酚还可以增加内源性NO生成<sup>[7]</sup>。而且大量的体外和体内研究已经证实了丙泊酚的细胞及器官保护作用<sup>[8]</sup>。提示丙泊酚有可能通

**基金项目:** 国家自然科学基金(No.81270196、31301104、81470405), 广东医科大学附属医院博士启动项目(No.XB1343)

**收稿日期:** 2017-04-23; **修订日期:** 2017-06-29

**作者简介:** 胡 喆(1976-), 女, 博士, 讲师。

过抑制内皮细胞自噬以保护血管内皮。故本实验将探讨丙泊酚保护Ang II诱导人脐静脉内皮细胞损伤的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞HUVECs细胞株(上海细胞库),经解冻复苏后加入含10%胎牛血清的DMEM培养基制成细胞悬液,接种于培养瓶中置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养。每隔2~3 d换培养液1次,待细胞80%融合时用0.25%胰蛋白酶消化传代,选取第3~4代细胞进行实验。

DMEM培养基(Life公司);青霉素-链霉素混合溶液与0.25%胰蛋白酶(碧云天);胎牛血清(Gibco公司);磷酸盐缓冲液(PBS)(上海生工);二甲基亚砜(DMSO)(Life公司);裂解液及蛋白酶抑制剂(碧云天);β-actin与HRP标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗(Proteintech公司);细胞色素C、p62抗体(Abcam公司);LC3b抗体(Sigma公司);CCK8试剂盒(Tran公司)。

细胞培养箱(Thermo公司);超净台(苏净集团安泰公司);激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS SP5 II);酶标仪(BioTek公司);凝胶电泳及蛋白质转膜、化学发光、成像系统(Bio-Rad公司);电子恒温摇床(Thermo公司)。

### 1.2 实验分组与干预

将细胞随机分组。正常对照组(NC):常规培养;Ang II损伤组(Ang II):细胞密度达80%以上,换入含Ang II终浓度分别为10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> mol/L的无糖无血清培养液,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的常氧培养箱中培养24 h后,换成含10%血清的完全培养液,继续培养4 h,丙泊酚处理内皮细胞Ang II损伤组(Ang II+P),细胞经Ang II(10<sup>-6</sup> mol/L)处理24 h后,换入含丙泊酚浓度分别为50、100、150 μmol/L的完全培养液,继续培养4 h,二甲基亚砜溶剂对照组(DMSO):10<sup>-6</sup> mol/L的Ang II处理细胞24 h后,置换含DMSO体积百分比为1%的完全培养基,继续培养4 h,血管紧张素1-7抑制剂组(P+A779):10<sup>-6</sup> mol/L的Ang II处理细胞24 h后弃去培养液,置换含丙泊酚浓度为100 μmol/L的完全培养液,并加入A779处理,继续培养4 h。

### 1.3 用CCK8检测细胞活性

将HUVECs制成2×10<sup>4</sup>个/mL的细胞悬液,在96孔板中每孔接种100 μL的细胞悬液。6 h后观察细胞贴壁,吸去旧培养液,分别加入含10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、

10<sup>-4</sup> mol/L Ang II的HUVECs培养液。对照组中加入等体积的正常培养基。另设空白组(只有培养液,不含细胞),每组5个复孔。培养24 h后,每孔分别加入含10 μL的CCK8检测试剂,培养箱孵育2 h后使用酶标仪检测波长为450 nm的吸光度(A)值,并计算细胞抑制率(Inhibitory rate, IR)。IR=(对照孔A值-实验孔A值)/对照孔A值×100%。实验重复3次。

确认Ang II的最适浓度后,观察丙泊酚对Ang II损伤HUVECs活性的影响。每孔加入Ang II处理24 h后,换入丙泊酚至终浓度为50、100、150 μmol/L, DMSO组则每孔加入体积百分比为1%的DMSO,继续培养4 h。其他步骤同前。实验重复3次。

### 1.4 免疫荧光染色检测细胞色素C

按细胞分组处理后,4%多聚甲醛溶液37℃固定15 min, PBS液清洗3次。用体积分数0.1% Triton X-100室温打孔15 min, PBS液在摇床清洗3次,按产品说明书稀释一抗,室温孵育1 h。最后用激光扫描共聚焦显微镜观察。每张切片随机选取几个视野(×400)拍摄照片。实验重复3次。

### 1.5 蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白的表达

制备胶块。按细胞分组并处理后,收集蛋白质悬液,100℃变性,加样,电泳,转膜,室温摇床封闭1 h(5%脱脂牛奶封闭液),然后剪膜,分别加入目的蛋白抗体及β-actin(1:1 000),4℃摇床过夜。隔日分别加入抗鼠或抗兔二抗(1:10 000),室温摇床孵育2 h以上。ECL试剂化学发光检测,最后曝光。采用Image J软件处理图片。实验重复3次。

### 1.6 统计学处理

本实验使用SPSS 24.0统计软件进行统计描述,多个样本均数间每两个样本均数的比较采用 $q$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 丙泊酚对Ang II损伤HUVECs活性的影响

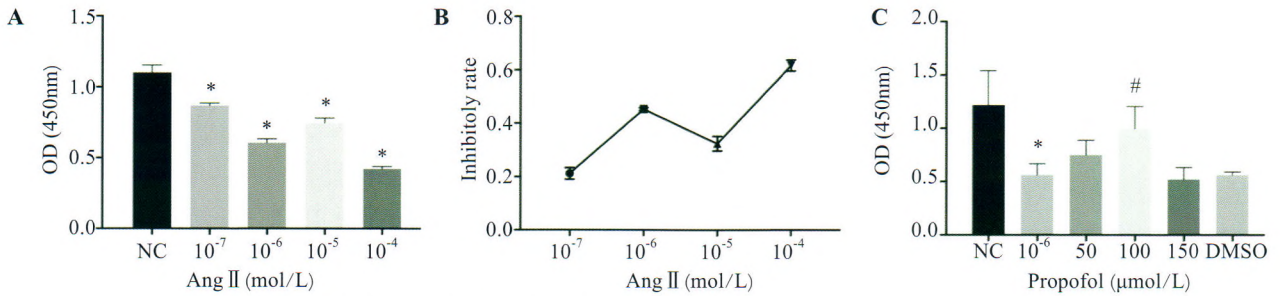
用不同浓度(10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> mol/L)Ang II处理HUVECs 24 h,抑制率分别为(21.15±2.10)%、(45.2±0.54)%、(32.39±2.70)%和(61.66±2.06)%,明显高于对照组( $P<0.05$ )。我们选择用10<sup>-6</sup> mol/L Ang II诱导HUVECs损伤。Ang II+P(50、100 μmol/L)组细胞活性高于Ang II组( $P<0.05$ ),而Ang II+P(150 μmol/L)组与DMSO组、Ang II组比较细胞活性差异无统计学意义( $P>0.05$ )(图1)。

### 2.2 丙泊酚对Ang II引起的HUVECs线粒体自噬的

影响

免疫荧光染色显示(图2), Ang II 组和DMSO组的线粒体释放细胞色素 C较Ang II +P组增加( $P < 0.05$ ), 而P+A779组与Ang II 组和DMSO组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。蛋白印迹检测结果(图3)发

现, 不同浓度(50、100  $\mu\text{mol/L}$ )Ang II +P组的促自噬蛋白P62表达水平略高于DMSO组, 且自噬相关蛋白LC3- I 向LC3- II 的转化亦增多, 但差异均不明显( $P > 0.05$ )。



A: 不同浓度Ang II 处理HUVECs 24 h后的OD值;  
 B: 不同浓度Ang II 处理HUVECs 24 h后细胞的抑制率(IR);  
 C: 不同浓度丙泊酚作用于Ang II( $10^{-6}$  mol/L)预处理内皮细胞的OD值。  
 Ang II 各浓度组与NC组比较,  $*P < 0.05$ ; Ang II +P (100  $\mu\text{mol/L}$ )组与Ang II 组比较,  $\#P < 0.05$ 。

图1 CCK8细胞活性实验筛选Ang II 及丙泊酚作用浓度

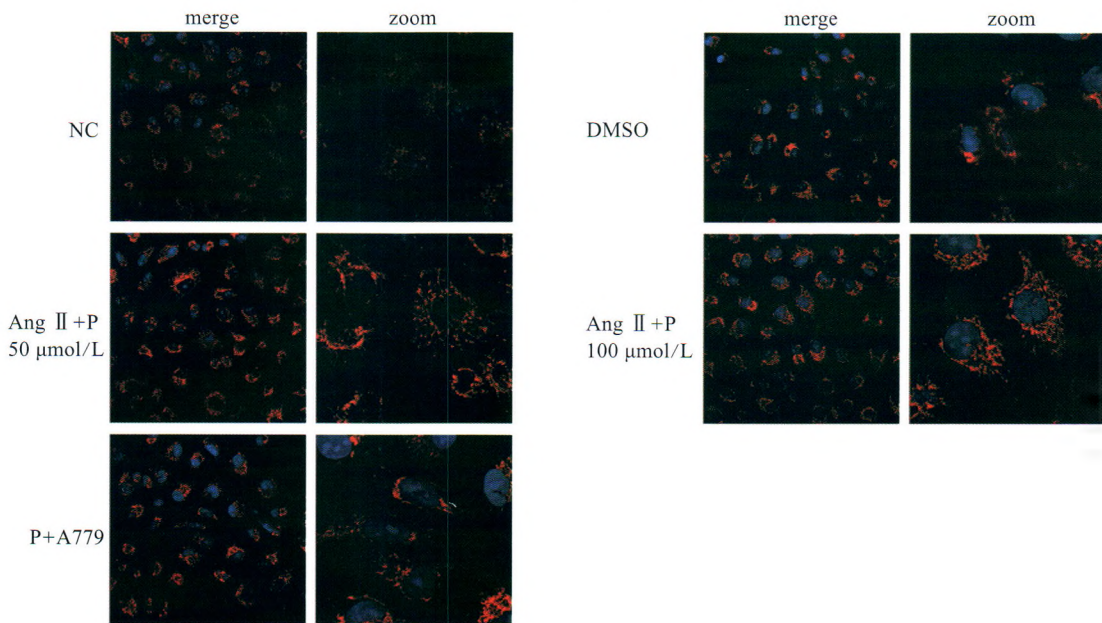


图2 丙泊酚抑制线粒体释放细胞色素C

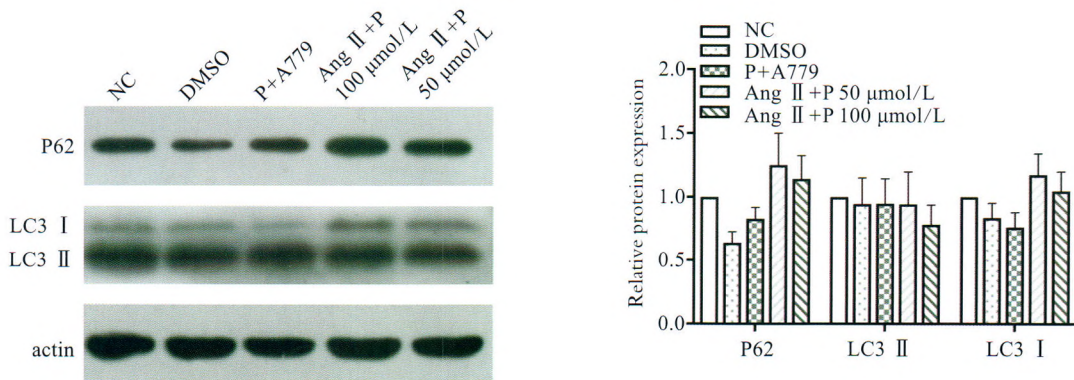


图3 不同浓度丙泊酚处理促进自噬相关蛋白的表达

### 3 讨论

血管内皮细胞是血管内腔隙与血管外组织之间的一个关键屏障,分布在整个心血管系统,具有调节血流、血管舒缩、血液凝固、细胞因子分泌等功能<sup>[9]</sup>,在许多疾病的病理生理情况下起着关键性作用<sup>[10]</sup>。Ang II作为引起氧化应激最强烈的刺激物之一,在血管内皮衰老和凋亡过程中被认为是增强因子<sup>[11]</sup>。本研究发现,高于生理浓度( $10^{-7}$  mol/L)的Ang II作用于HUVECs 24 h后,与对照组相比,细胞的活性抑制率明显升高( $P < 0.05$ )。而不同浓度Ang II + P组与Ang II组相比,活性有所恢复,丙泊酚在100  $\mu$ mol/L浓度下保护作用最明显。

自噬作为机体一种通过溶酶体系统降解自身成分的一种防御和应激调控机制,对于清除聚集的氧化应激产物和受损的细胞器以及细胞稳态具有至关重要的作用<sup>[12]</sup>。但是,自噬的过度激活可以带来负面影响,如线粒体的受损和ATP耗竭导致细胞走向死亡<sup>[13]</sup>。我们的实验结果显示,DMSO组的线粒体释放细胞色素C较Ang II + P组增加,而P + A779组与DMSO组无差异,证明丙泊酚可以抑制线粒体释放细胞色素C,而A779可以减弱丙泊酚的抑制作用。而通过蛋白印迹检测自噬相关蛋白LC3-II的表达变化,我们发现Ang II对人脐静脉内皮细胞P62、LC3-II蛋白表达有促进作用,说明Ang II能够诱导血管内皮细胞发生自噬。然而,不同浓度(50、100  $\mu$ mol/L)Ang II + P组的促自噬蛋白P62表达水平略高于DMSO组,且自噬相关蛋白LC3-I向LC3-II的转化亦增多,但差异不明显,提示丙泊酚可能部分通过影响线粒体自噬途径来抑制Ang II引起的内皮细胞凋亡。最近一项研究显示,丙泊酚能通过增强自噬促进人脐静脉内皮细胞的血管形成,但其研究的细胞自噬诱导模型是通过脂多糖(LPS)实现的<sup>[14]</sup>。

肾素-血管紧张素系统广泛参与多种心血管疾病的发生、发展过程,Ang II则是这些病理生理改变的中心环节。除了传统的ACE-Ang II-AT1R的经典轴外,新的RAS成员:ACE2-Ang(1-7)-Mas已被发现。ACE2分布广泛,主要在内皮细胞中表达,而在其他组织细胞中表达较少。ACE2与ACE的结构相似,但ACE2发挥着与ACE拮抗的作用。ACE2水解Ang II产生7肽的Ang(1-7),然后与其受体Mas结合,Ang(1-7)发挥着与Ang II相反的生理活性<sup>[15]</sup>。Ang(1-7)结合到其内皮细胞上的受体,通过产生内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)

源性NO,激活蛋白酪氨酸磷酸酶,降低MAPK的活性,抑制还原性辅酶II(NADPH)氧化酶源性过氧化物(reactive oxygen species, ROS)的生成,介导血管舒张、生长抑制、抗炎和抗血栓等,以对抗Ang II的作用<sup>[16]</sup>。本实验使用MAS受体拮抗剂A779,发现其可以逆转丙泊酚对Ang II诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的保护作用,初步探究了丙泊酚可能通过ACE2-Ang(1-7)-Mas轴调控血管内皮细胞的命运。但对丙泊酚、ACE2-Ang(1-7)-Mas和血管内皮细胞损伤三者关系仍需要进一步研究,将为临床应用丙泊酚处理保护心血管疾病患者血管内皮提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] Mansoori A, Oryan S, Nematbakhsh M. Role of Mas receptor antagonist (A779) in renal hemodynamics in condition of blocked angiotensin II receptors in rats[J]. *Physiol Int*, 2016, 103(1): 13-20.
- [2] Ferreira A J, Santos R A, Raizada M K. Angiotensin-(1-7)/angiotensin-converting enzyme 2/mas receptor axis and related mechanisms[J]. *Int J Hypertens*, 2012, 2012: 690785.
- [3] Gomes E R, Santos R A, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes[J]. *Int J Hypertens*, 2012, 2012: 493129.
- [4] Sugamura K, Keaney J J. Reactive oxygen species in cardiovascular disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(5): 978-992.
- [5] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [6] Qi Y F, Zhang J, Wang L, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits high-mobility group box 1 and attenuates cardiac dysfunction post-myocardial ischemia[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(1): 37-49.
- [7] Wu H, Li Y, Wang Y, et al. Tanshinone IIA attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via modulating angiotensin-converting enzyme 2/ angiotensin- (1-7) axis in rats[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(6): 578-586.
- [8] Ozkan F, Senayli Y, Ozyurt H, et al. Antioxidant effects of propofol on tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury: an experimental study[J]. *J Surg Res*, 2012, 176(2): 601-607.
- [9] Pober J S, Sessa W C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(10): 803-815.
- [10] Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, et al. Angiotensin

(下转第341页)

总之,本实验通过建立结肠癌L-OHP耐药细胞株LOVO/L-OHP,初步探讨了IL-6在其中的可能作用。不仅揭示了肿瘤细胞对铂类药物耐药机制的复杂性,更为重要的是指出靶向IL-6而非其受体可作为L-OHP治疗结肠癌的有效补充。

#### 参考文献:

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (1): 5-29.
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] 万得森,李进. 结肠癌临床实践指南(中国版). 2011版[EB/OL]. <http://www.nccnchina.org/nccn-guidelines-china.aspx>.
- [4] Zhang G J, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma [J]. Anticancer Res, 1999, 19(2): 1427-1432.
- [5] Chen C C, Chu C B, Liu K J, et al. Gene expression profiling for analysis acquired oxaliplatin resistant factors in human gastric carcinoma TSGH-S3 cells: The role of IL-6 signaling and Nrf2/AKR1C axis identification[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(7): 872- 887.
- [6] Duan S, Tsai Y, Keng P, et al. IL-6 signaling contributes to cisplatin resistance in non- small cell lung cancer via the up-regulation of anti-apoptotic and DNA repair associated molecules[J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 27651-27660.
- [7] Liao Q, Zeng Z, Guo X, et al. LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via inhibiting the Stat3 activation[J]. Oncogene, 2014, 33 (16): 2098-2109.
- [8] Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction[J]. Brit J Cancer, 2014, 110(2): 469-478.
- [9] Wang Z Y, Zhang J A, Wu X J, et al. IL-6 inhibition reduces STAT3 activation and enhances the antitumor effect of carboplatin[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 8026494.
- [10] Ying J, Tsujii M, Kondo J, et al. The effectiveness of an anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody combined with chemotherapy to target colon cancer stem-like cells[J]. Int J Oncol, 2015, 46(4): 1551-1559.
- [11] Spitzner M, Roesler B, Bielfeld C, et al. STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2014, 134(4): 997-1007.
- [12] Shimazaki J, Goto Y, Nishida K, et al. In patients with colorectal cancer, preoperative serum interleukin-6 level and granulocyte/lymphocyte ratio are clinically relevant biomarkers of long-term cancer progression [J]. Oncology, 2013, 84(6): 356-361.
- [13] Lee H J, Zhuang G, Cao Y, et al. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells[J]. Cancer Cell, 2014, 26(2): 207-221.

~~~~~  
(上接第336页)

- II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(4): 943-948.
- [11] Erusalimsky J D. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology[J]. J Appl Physiol (1985), 2009, 106(1): 326-332.
- [12] Majeski A E, Dice J F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2435-2444.
- [13] Young A R, Narita M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 234-240.
- [14] Shan H, Guo D, Li X, et al. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells[J]. APMIS, 2014, 122(10): 985-992.
- [15] Crackower M A, Sarao R, Oudit G Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. Nature, 2002, 417(6891): 822-828.
- [16] Milanovic D, Pesic V, Loncarevic-Vasiljkovic N, et al. The fas ligand/fas death receptor pathways contribute to propofol-induced apoptosis and neuroinflammation in the brain of neonatal rats[J]. Neurotox Res, 2016, 30(3): 434-452.