

## · 论著 ·

## 异丙酚对急性呼吸窘迫综合征时肾 Gq/11 蛋白的干预作用

艾奴尔·加里里 克拉拉·阿巴斯 买买提祖农 张丽 李秀娟

**【摘要】** 目的 探讨异丙酚是否通过影响 Gq/11 蛋白的表达对肾脏起保护作用。方法 采用尾静脉注射油酸(OA)法复制急性呼吸窘迫综合征(ARDS)大鼠模型。将健康雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组(C组)、OA 组和异丙酚预处理组(P组),并观察血压及相关酶的变化。用蛋白质免疫印迹法检测肾脏中 Gq/11 蛋白含量。结果 P 组 Gq/11 蛋白含量 $[(124.68 \pm 19.38)\%]$ 较 C 组 $[(100.00 \pm 0)\%]$ 增加了 $(24.68 \pm 19.38)\%$  $(P < 0.01)$ ,但明显低于 OA 组 $(149.34 \pm 20.04)\%$  $(P < 0.01)$ 。P 组肾组织血管紧张素转换酶 $[(16.52 \pm 1.37) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ 、乳酸脱氢酶 $[(1.20 \pm 0.16) \text{kU/g}]$ 活性和丙二醛 $[(1.51 \pm 0.35) \mu\text{mol/g}]$ 含量也均明显低于 OA 组分别为 $[(17.56 \pm 1.02) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ , $(1.41 \pm 0.16) \text{kU/g}$ , $(1.94 \pm 0.16) \mu\text{mol/g}$ , $P$  均 $< 0.01$ 。结论 预先注射异丙酚能降低 Gq/11 蛋白在肾脏中的含量,并减轻 ARDS 时肾损害的程度。

**【关键词】** 异丙酚; Gq/11 蛋白; 肾脏; 急性呼吸窘迫综合征; 大鼠

**Influence of propofol on Gq/11 protein in kidney during acute respiratory distress syndrome** Ainuer · Jialili, Kelala · Abasi, Maimaitizunong, ZHANG Li, LI Xiu-juan. Department of Physiology, Xinjiang Medical University, Wulumuqi 830054, Xinjiang, China

**【Abstract】** **Objective** To explore whether propofol plays a protective role in kidney injury during acute respiratory distress syndrome (ARDS) by affecting the expression of Gq/11 protein. **Methods** An ARDS model in rats was reproduced by intravenous injection of oleic acid (OA). Healthy Wistar rats were randomly divided into pre-treatment group in which rats received propofol before given OA (P group), OA group with rats received propofol 90 minutes after iv OA (OA group) and control group (C group). Blood pressure, plasma and kidney homogenate contents of angiotensin-conversion enzyme (ACE), lactate dehydrogenase (LDH) activity and malondialdehyde (MDA) were assessed during the experimental period, and the concentration of Gq/11 protein was determined by Western blot. **Results** The concentration of Gq/11 protein of P group  $[(124.68 \pm 19.38)\%]$  was increased  $(24.68 \pm 19.38)\%$  compared with C group  $[(100.00 \pm 0)\%]$ ,  $P < 0.01$ , and it was obviously decreased compared with OA group  $[(149.34 \pm 20.04)\%]$ ,  $P < 0.01$ . ACE  $[(16.52 \pm 1.37) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ , LDH activity  $[(1.20 \pm 0.16) \text{kU/g}]$  and MDA content  $[(1.51 \pm 0.35) \mu\text{mol/g}]$ , respectively, in homogenate of P group were lower than OA group  $[(17.56 \pm 1.02) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ ,  $(1.41 \pm 0.16) \text{kU/g}$ ,  $(1.94 \pm 0.16) \mu\text{mol/g}$ , respectively, all  $P < 0.01$ . **Conclusion** Pre-treatment with propofol can reduce the concentration of Gq/11 protein in kidney tissue, and it can ameliorate the injury to the kidney during ARDS.

**【Key words】** propofol; Gq/11 protein; kidney; acute respiratory distress syndrome; rat

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)以进行性呼吸困难和难以纠正的低氧血症为主要表现,实质上是多种致病因子启动下引起的机体广泛炎症反应<sup>[1,2]</sup>,其后果严重,治疗的关键在于早发现、早确诊、早控制免疫因子释放。有研究者试图用免疫抑制剂或抗菌、抗内毒素来控制 ARDS 发展,但到目前为止各家报道结果不一。异丙酚作为一种短效静脉麻醉药,已证实其具有良好的抗氧化和抑制细胞因子释放功能,而许多细胞因子如内皮素(ET)、血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)等的受体均与 Gq/11 蛋白耦联,可通过肌醇磷脂信号转导系统的级联反应,使这些炎症信号在机体得

以放大,并造成细胞损伤<sup>[3]</sup>。本实验中通过观察异丙酚对 ARDS 时肾脏中 Gq/11 蛋白含量变化的影响,探讨从控制炎症介质的信号转导方面为防治 ARDS 致多器官功能障碍综合征(MODS)提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 动物模型制备及实验分组:**健康雄性 Wistar 大鼠 24 只,体重 200~250 g(新疆医科大学实验动物中心提供),按随机数字表法分为对照组(C组)、油酸组(OA组)和异丙酚预处理组(P组),每组 8 只。以质量分数为 1%的戊巴比妥钠 7~8 ml/kg 腹腔注射麻醉动物,仰卧固定行颈总动脉插管监测血压。OA 组由尾静脉注射 OA 0.2 ml/kg(2 min 内注完)复制 ARDS 模型,观察 90 min。C 组从尾静脉注入等剂量生理盐水。P 组经左颈静脉注射异丙酚 100 mg · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> 30 min 后,由尾静脉缓慢注射

基金项目:新疆维吾尔自治区少数民族科技骨干人才特殊培养专项基金(2004-13)

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学生理教研室

作者简介:艾奴尔·加里里(1960-),女(哈萨克族),新疆人,医学硕士,副教授。

OA 0.2 ml/kg(2 min 内注完), 观察 90 min。取所有动物颈动脉血, 一部分测定血气分析, 另一部分制备血浆(1 000×g 离心 10 min 取上清液)以检测相关指标。放血处死动物, 剖腹取肾脏, 4℃生理盐水冲洗, 滤纸吸干后, -20℃保存待用。

**1.2 制备肾脏细胞膜:**取 0.7 g 肾组织加入 10 倍匀浆液[成分: 10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl), 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 250 mmol/L 蔗糖, pH 7.4], 用玻璃匀浆器制备匀浆; 平衡后在 4℃下 1 000×g 离心 10 min, 取血清; 平衡后在 4℃下 20 000×g 离心 40 min, 沉淀悬浮于匀浆液中; 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 用 Lowry 法测定细胞膜的浓度后分装, -20℃保存。

**1.3 血浆和肾组织匀浆中血管紧张素转换酶(ACE)、乳酸脱氢酶(LDH)活性及丙二醛(MDA)含量测定:**取血 1 ml, 1 000×g 离心 15 min; 取上清液 0.05 ml, 肾组织匀浆 0.05 ml; 加 20 mmol/L 马尿酸组氨酸、亮氨酸 0.05 ml, 37℃孵育 15 min; 加入终止液和中和液后显色。用紫外比色法测定生成的马尿酸含量, 以每分钟产生 1 μmol 马尿酸作为 1 个 ACE 活性单位; 用乳酸钠比色法测定 LDH 活性; 用硫代巴比妥酸比色法对 MDA 含量进行测定; 各项操作均严格按照试剂盒说明书进行。

**1.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot)测定 Gq/11 蛋白含量:**取 80 μg 肾组织的细胞膜蛋白, 用质量分数为 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 4℃、25 V、10~12 h 将蛋白电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上; 用质量分数为 5% 的脱脂奶粉/磷酸盐缓冲液(PBS)进行非特异封闭; PBS 冲洗后, 加入抗 Gq/11 蛋白的多克隆抗体(Santa Cruz 生物技术公司), 4℃过夜; 用质量分数为 0.5% 吐温(Tween)PBS 冲洗后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育 1 h 后冲洗; 加入化学发光剂(Amersham 公司)进行曝光, 用 LEICA-11550 ICW 图像分析系统扫描区带积分吸光度。

**1.5 统计学处理:**结果用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。使用 SPSS 10.0 统计软件对各组资料进行比较, 多组间比较用单因素方差分析, 组间比较用 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 动脉血气变化(表 1):**与 C 组比较, OA 组 pH 值、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)均显著下降, 动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)则升高( $P$  均  $< 0.01$ )。P 组 PaO<sub>2</sub> 和 pH 均较 C 组降低, 但较 OA 组显著增高; 而

PaCO<sub>2</sub> 较 C 组升高, 但低于 OA 组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。提示大鼠在注射 OA 90 min 后已有明显的 ARDS 表现。

表 1 各组大鼠动脉血气的变化( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Changes of arterial blood gases in each group( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	pH	PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	PaCO <sub>2</sub> (mm Hg)
C 组	7.40±0.04	92.40±3.75	33.90±2.78
OA 组	7.20±0.08**	54.38±3.83**	46.50±2.25**
P 组	7.30±0.06**△△	70.95±6.45**△△	38.78±5.18*△△

注: 与 C 组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 OA 组比较:

△△ $P < 0.01$ ; 1 mm Hg=0.133 kPa

**2.2 血浆和肾组织 ACE、LDH 活性及 MDA 含量的变化(表 2, 表 3):**P 组血浆和肾组织 LDH 活性及 MDA 含量均较 C 组明显升高, 但低于 OA 组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。P 组血浆 ACE 活性较 C 组降低, 但高于 OA 组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。而 P 组肾组织 ACE 活性高于 C 组, 但低于 OA 组( $P$  均  $< 0.01$ )。

表 2 各组大鼠血浆 MDA、LDH 和 ACE 的变化( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Changes of plasma MDA, LDH and ACE levels in each group( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	MDA(μmol/L)	LDH(kU/L)	ACE(μmol·min <sup>-1</sup> ·L <sup>-1</sup> )
C 组	2.33±0.35	6.27±1.70	19.87±3.11
OA 组	5.54±1.09**	12.51±1.13**	13.73±2.04**
P 组	3.31±0.60**△△	8.23±0.64*△△	16.77±1.96*△△

注: 与 C 组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 OA 组比较:

△△ $P < 0.05$ , △△ $P < 0.01$

表 3 各组大鼠肾脏 MDA、LDH 和 ACE 的变化( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Changes of MDA, LDH and ACE levels in renal tissues in each group( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	MDA(μmol/g)	LDH(kU/g)	ACE(μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> )
C 组	0.98±0.42	0.64±0.09	13.67±2.26
OA 组	1.94±0.16**	1.41±0.16**	17.56±1.02**
P 组	1.51±0.35**△△	1.20±0.16**△△	16.52±1.37**△△

注: 与 C 组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 OA 组比较: △△ $P < 0.01$

**2.3 肾功能和 MAP 的变化(表 4):**与 C 组比较, P 组和 OA 组血尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)含量均显著升高( $P$  均  $< 0.01$ ); 与 OA 组比较, P 组两个值略升高, 但差异均无显著性( $P$  均  $> 0.05$ )。平均动脉压(MAP)与 BUN 和 Cr 呈负相关(MAP 与 OA 组的相关系数  $r = -0.725, P < 0.01$ )。

**2.4 Western blot 测定肾脏 Gq/11 蛋白含量的结果(表 4, 图 1):**注射 OA 90 min 后, 肾脏 Gq/11 蛋白含量较 C 组增加了(49.34±20.04)%( $P < 0.01$ ); P 组也较 C 组增加了(24.69±19.38)%( $P < 0.01$ ), 但与 OA 组比较显著降低( $P < 0.01$ )。

表 4 各组大鼠 Gq/11 蛋白、肾功能及

MAP 的变化 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )Table 4 Changes of Gq/11 protein, renal function and MAP in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	肾脏 Gq/11 (%)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)	MAP (mmHg)
C 组	100.00 ± 0	5.55 ± 0.68	58.63 ± 3.65	124.88 ± 8.33
OA 组	145.34 ± 20.04**	10.86 ± 0.75**	79.75 ± 2.71**	92.55 ± 7.43**
P 组	124.68 ± 19.38**△△	11.97 ± 0.95**	92.75 ± 6.54**	74.55 ± 19.80**

注:与 C 组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 OA 组比较:△ $P < 0.01$ 

Gq/11 蛋白 42-43 ku

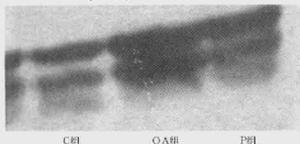


图 1 Western blot 测定 ARDS 大鼠肾脏 Gq/11 蛋白的含量

Figure 1 Content of Gq/11 protein in renal tissue of rats with ARDS detected by Western blot

### 3 讨论

目前研究发现,参与 ARDS 发病的多种炎症介质中绝大多数最终都要通过 G 蛋白将信号转导至效应器而发挥作用。Gq/11 蛋白作为 G 蛋白中的一种,可以和多种激素、肽类及炎症介质的受体耦联,在 ARDS 引起的细胞损伤过程中可能具有一定的作用<sup>[4]</sup>。异丙酚是一种新型静脉麻醉药,其抗氧化作用与其特殊的分子结构有关;它具有与维生素 E、丁酰基苯结构相似的抗氧化作用的酚结构,可干扰脂质过氧化的链式反应,中断脂质过氧化的链式反应<sup>[5]</sup>。本课题组既往的研究显示,预先注射异丙酚能降低 Gq/11 蛋白在 ARDS 时肺组织的表达,减轻肺损伤。本实验中进一步研究了异丙酚预处理后 ARDS 时肾脏中 Gq/11 蛋白含量的动态变化以及其与肾功能损伤的相关性。用 OA 导致 ARDS 后,随着时间的延长,血浆和肾脏中 LDH 活性、MDA 含量逐渐升高,表明细胞已受损,使细胞膜通透性增加;血浆中 ACE 活性的降低,也可能与肺毛细血管内皮细胞损害、合成 ACE 和释放入血减少有关<sup>[6]</sup>;肾脏 ACE 活性、血浆 BUN 和 Cr 含量增加,在很大程度上反映了肾的缺血。以上数据说明了 ARDS 时肺和肾功能已受到损害。P 组动脉血压未得到改善,反而较 OA 组更低,可能与异丙酚对心血管系统的抑制作用有关。但血浆和肾组织中 LDH 活性、MDA 含量已明显下降,血浆中 ACE 活性回升,肾组织中 ACE 活性降低,这些都提示异丙酚可减轻 ARDS 时引起的肾损伤程度,并且对肾脏具有保护作用。这

种保护作用的机制是多位点的,包括异丙酚直接清除氧自由基,抑制脂质过氧化反应,调节钙离子平衡等<sup>[5,7,8]</sup>。本实验中 OA 组肾组织 Gq/11 蛋白含量明显升高,ARDS 时 Gq/11 蛋白含量降低,但仍高于 C 组。表明在 ARDS 过程中与 Gq/11 蛋白耦联受体的信号转导发生了异常,而 Gq/11 蛋白可以加强与 ET、TXA<sub>2</sub>、血管紧张素 II (Ang II) 等受体的耦联,引起血管痉挛<sup>[9]</sup>;致使全身血流动力学紊乱,肾脏血液灌流量锐减,缺血、缺氧损害加重。另外,前列腺素 E<sub>2</sub>、白细胞介素-8 等炎症介质通过其受体与 Gq/11 蛋白耦联<sup>[10]</sup>,激活磷脂酶 C 生成细胞内信使三磷酸肌醇 (IP3) 和脂酰甘油 (DAG)。IP3 激活胞内储存 Ca<sup>2+</sup> 释放, Ca<sup>2+</sup> 与 DAG 激活蛋白激酶 C,进而活化磷脂酶 A<sub>2</sub> 造成细胞膜和细胞器损伤<sup>[11]</sup>,并使肌醇磷脂产生大量与炎症反应密切相关的花生四烯酸, Ca<sup>2+</sup> 与 IP3 触发巨噬细胞释放大量趋化及活性因子,进而使中性粒细胞、内皮细胞等多种炎性细胞广泛激活,炎症信号在肾脏不断放大,使肾脏损伤进一步加重。本实验结果显示,异丙酚能降低 ARDS 时 Gq/11 蛋白表达,可能与部分阻断炎症信号转导有一定关系,从而在 ARDS 过程中对肾脏起一定保护作用。

### 参考文献:

- Bernard G R, Arriaga A, Brigham K L, et al. The American European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149: 818-824.
- 郭仑. ARDS 与 MODS 二者发病机制的相互关联性 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 69-70.
- 姚咏明, 盛志明. 脓毒症信号转导机制的现代认识 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 3-6.
- 孙中吉, 卢青, 李银平. 急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎性介质 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 186-189.
- 柯齐候, 侯俊, 陈春, 等. 异丙酚对兔主动脉阻断脊髓细胞死亡的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 426-429.
- 郑辉, 葛萍. 肺损伤与血管紧张素转换酶 [J]. 北京医学, 1998, 10: 300-301.
- 高巨, 曹邦雄. 异丙酚与 SIRS [J]. 国外医学·麻醉学与复苏分册, 2003, 24: 26-29.
- 林丽娜, 王乃敏, 吴进泽, 等. 异丙酚对围术期缺血/再灌注损伤肝组织的保护作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 42-44.
- Ghosh M, Smrcka A V. Assay for G protein-dependent activation of phospholipase C beta using purified protein components [J]. Methods Mol Biol, 2004, 237: 67-75.
- Keane M P, Strieter R M. Chemokine signaling in inflammation [J]. Crit Care Med, 2000, 28(4 Suppl): N13-26.
- 洪新如, 李明. 静脉注射三种阿片拮抗剂对大鼠失血性休克效果的比较 [J]. 中国药理学通报, 1995, 11: 295-298.

(收稿日期: 2006-06-01)

(本文编辑: 李银平)