

· 实验研究 ·

脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性中线粒体 凋亡途径相关蛋白的变化

唐靖 杨希营 隽兆东 张皓云 孙丽娜 朱政

【摘要】 目的 检测脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性作用中线粒体凋亡通路相关蛋白的变化,探讨脂肪乳剂逆转布比卡因心脏毒性的可能机制。方法 日龄 1~3 d 的健康 SD 大鼠乳鼠,取其心室肌进行体外原代培养,用含有布比卡因的培养基培养 24 h 来建立心肌细胞布比卡因中毒模型。实验分组:空白对照组(C组)、布比卡因组(B组)、布比卡因+脂肪乳剂组(BL组)。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,采用 Western blot 法检测细胞内细胞色素 C(cytochrome C, Cyto-C)和活化的 caspase-3 蛋白含量。结果 与 C 组比较,B 组和 BL 组细胞凋亡率明显升高,且 B 组明显高于 BL 组($P < 0.05$)。与 C 组比较,B 组和 BL 组 Cyto-C 和活化的 caspase-3 含量均明显升高($P < 0.05$),且 B 组明显高于 BL 组($P < 0.05$)。结论 脂肪乳剂可能通过抑制线粒体 Cyto-C 释放,降低 caspase-3 激活来调节细胞凋亡,从而发挥保护心肌细胞的作用。

【关键词】 线粒体;细胞凋亡;脂肪乳剂;布比卡因;心肌毒性

Protein expression changes of mitochondrial apoptotic pathway during the reverse effects of lipid emulsion on bupivacaine cardiotoxicity TANG Jing, YANG Xiyang, JUAN Zhaodong, ZHANG Haoyun, Sun Lina, ZHU Zheng. Weifang Medical University, Weifang 261053, China

Corresponding author: JUAN Zhaodong, Email: juanzd@wfmuc.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To detect the protein expression changes of mitochondrial apoptotic pathway during the reverse effects of lipid emulsion on bupivacaine cardiotoxicity, so as to investigate the probable mechanism concerning the reverse effect of lipid emulsion on bupivacaine cardiotoxicity. **Methods** The ventricular muscles of 15 healthy SD neonatal mice (1-3 d) were chosen to conduct primary culture in vitro. And the cardiomyocytes were cultivated in a medium containing bupivacaine for 24 hours to establish its bupivacaine poisoning model. The cultured cardiomyocytes were divided into three groups: control group (group C); bupivacaine group (group B); and bupivacaine+lipid emulsion group (group BL). Flow cytometry was applied to examine the apoptosis of cardiomyocytes, and the Western blot was employed to detect the protein expression variation of cytochrome C (Cyto-C) and cleaved caspase-3. **Results** Compared with group C, the apoptosis rate was remarkably increased in both group B and group BL and that of the group B was dramatically higher than that of the group BL, with a statistical significance ($P < 0.05$). Compared with group C, the protein expression levels of both Cyto-C and cleaved caspase-3 were significantly increased in groups B and BL ($P < 0.05$), and the protein expression levels of both Cyto-C and cleaved caspase-3 in group B were significantly higher than those in group BL ($P < 0.05$). **Conclusion** Lipid emulsion can regulate apoptosis through inhibiting the release of mitochondrial Cyto-C and reducing caspase-3 activation, thus it protects cardiomyocytes.

【Key words】 Mitochondria; Apoptosis; Lipid Emulsion; Bupivacaine; Cardio Toxicity

布比卡因是临床上常用的长效酰胺类局部麻醉药,布比卡因中毒极易引起心律失常,且复苏相当困难。近年来研究发现,脂肪乳剂能够救治布比卡因所引起的心脏毒性,但机制尚不明确。课题组前期研究发现,脂肪乳剂可以减轻布比卡因对线粒体的损伤,提高线粒体膜电位水平^[1]。本研究通过

检测脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性过程中线粒体凋亡通路上细胞色素 C(cytochrome C, Cyto-C)和活化的 caspase-3 蛋白表达变化,研究脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性过程中对线粒体凋亡途径相关蛋白的影响,旨在进一步探究脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性的相关机制。

材料与方法

原代心肌细胞的培养 参照吴丹等^[2]原代心肌细胞培养方法,结合实验室条件改良培养。取 SD

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2012HM080);潍坊医学院科技创新基金(K1302009)

作者单位:261053 潍坊医学院麻醉学系(唐靖、杨希营、隽兆东、孙丽娜、朱政),临床医学系(张皓云)

通信作者:隽兆东,Email:juanzd@wfmuc.edu.cn

大鼠乳鼠(日龄 1~3 d, 体重 6~8 g, 雌雄不拘) 30 只, 无菌条件下, 取心室肌, 0.1% 胰蛋白酶和 0.1% 的 II 型胶原蛋白酶 37℃ 水浴消化 8 min, 取上清加胎牛血清终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 10% 胎牛血清和 1% 双抗的高糖 DMEM 培养基吹打重悬。反复多次至消化完全。收集重悬液, 差速贴壁并调节细胞密度至 1×10^6 /ml, 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 48 h 后换液。

免疫细胞化学法鉴定心肌细胞 取部分原代心肌细胞重悬液接种于事先处理、铺有盖玻片的 6 孔板, 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 4 d。倒置相差显微镜下观察细胞生长状态及搏动情况。将长满心肌细胞的盖玻片置入预冷丙酮固定, 3% 过氧化氢处理, 37℃ 山羊血清孵育 30 min。4℃ 湿盒内鼠抗横纹肌肌动蛋白单抗过夜, 37℃ 过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体孵育 30 min, DAB 显色, 1×PBS 终止反应。室温下苏木精复染, 双蒸水清洗。乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 倒置显微镜下观察。

布比卡因中毒及逆转模型建立和分组 将其余原代心肌细胞重悬液接种至 25 T 细胞培养瓶培养 4 d 并随机分到空白对照组(C 组), 布比卡因处理组(B 组) 和布比卡因+脂肪乳剂处理组(BL 组), 各 6 个重复实验组。根据李振辉等^[1] 确定的布比卡因和脂肪乳剂干预的最佳量效关系, 依分组加入试剂: C 组: 用含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基处理; B 组: 用含有浓度为 1.376 mmol/L 的布比卡因和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基处理; BL 组: 用含有浓度为 1.376 mmol/L 的布比卡因、6% 中长链脂肪乳剂和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基处理。37℃、5% CO₂ 的培养箱中作用 24 h。

AnnexinV/PI 双染流式细胞分析法检测细胞凋亡率 选取 3 个随机重复组, 分别收集各重复组中 C 组、B 组、BL 组细胞及其上清液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 1×PBS 洗涤, 离心后 1×binding buffer 再重悬, 调节细胞浓度至 1×10^6 ml, 分别取 100 μl 重悬液加入 5 μl Annexin 和 5 μl PI 染色液, 吹打混匀, 避光 15 min; 再分别加入 400 μl 1×binding buffer, 轻柔吹打混匀, 避光并于 1 h 内分别进行流式细胞定量分析。总凋亡率为早期凋亡百分数和晚期凋亡百分数之和。

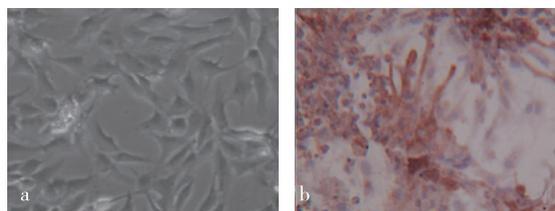
Western blot 法检测 Cyto-C 和活化的 caspase-3 蛋白含量 将剩余药物干预后的各组细胞除净培养基, 每瓶加入含有 PMSF 和 NaF 的 RIPA 裂解液 250 μl, 冰上作用 30 min, 收集于 EP 管内, 4℃ 下 12 000

r/min 离心 10 min, 集上清, BCA 法测定蛋白浓度并调节至 3 μg/μl。SDS-PAGE 电泳, 分离胶 15%, 浓缩胶 5%, 120 V 恒压电泳, 300 mA 恒流 90 min 将蛋白转至 0.22 μm PVDF 膜, 室温下含 5% 脱脂奶粉的 1×TBST 封闭 1 h。配制 Cyto-C(1:500, CST) 和活化的 caspase-3(1:500, CST) 抗体, 4℃ 恒速摇床过夜。室温下含 5% 脱脂奶粉的 1×TBST 封闭 1 h, 通用二抗室温孵育 2 h, 1×TBST 漂洗。暗室 ECL 发光, X 线片曝光, 扫描后用 Ipp 软件处理分析。

统计分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

倒置相差显微镜下观察原代心肌细胞 离体消化后的原代心肌细胞, 镜下呈类圆形悬浮于培养基中, 1 h 后心肌细胞开始贴壁生长。48 h 后细胞开始成簇生长, 相互丝状联系, 搏动变强并趋于一致。72 h 后细胞相互连接成网状, 搏动规则有力。免疫细胞化学染色后, 倒置显微镜下可见心肌细胞胞浆染色阳性, 胞浆呈棕色, 非心肌细胞胞浆染色阴性, 纯度可达 90% 以上(图 1)。



注: a, 48 h 的原代心肌细胞; b, 免疫染色后的心肌细胞

图 1 倒置相差显微镜下的原代心肌细胞(×200)

AnnexinV/PI 流式细胞检测细胞凋亡率 与 C 组比较, B 组和 BL 组早期凋亡率和总凋亡率明显升高(P<0.05); 与 B 组比较, BL 组早期凋亡率和总凋亡率明显降低(P<0.05)。

Cyto-C 和活化的 caspase-3 蛋白含量 与 C 组比较, B 组和 BL 组 Cyto-C 含量明显升高(P<0.05), 且 B 组明显高于 BL 组(P<0.05)(图 2); B 组和 BL 组中活化的 caspase-3 蛋白含量亦明显升高(P<0.05), 且 B 组明显高于 BL 组(P<0.05)(图 3)。

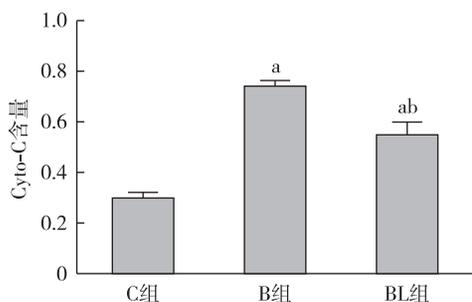
讨 论

脂肪乳剂在抢救布比卡因中毒造成的恶性心律

表 1 三组原代心肌细胞凋亡率的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

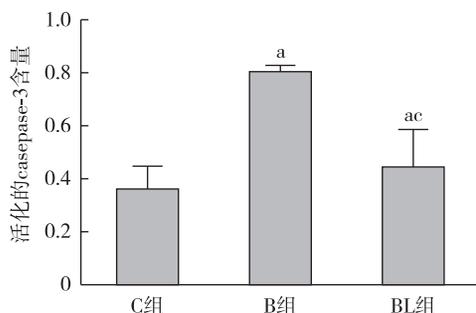
组别	重复组数	总凋亡率	早期凋亡率
C 组	3	13.7 ± 1.1	10.3 ± 0.8
B 组	3	29.5 ± 4.1 ^a	22.6 ± 3.4 ^a
BL 组	3	19.1 ± 3.5 ^{ab}	13.4 ± 2.4 ^{ab}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 三组原代心肌细胞胞质中 Cyto-C 蛋白含量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 三组原代心肌细胞胞质中活化的 caspase-3 蛋白含量的比较

失常过程中效果显著,但脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性的机制尚不明确,其临床应用缺乏科学的理论指导。研究发现布比卡因能够抑制心肌细胞的活性,严重影响心肌细胞的能量代谢并导致心肌细胞的凋亡^[3],前期的实验也发现,随着作用于原代心肌细胞的布比卡因浓度的升高,心肌细胞的活力逐渐下降,脂肪乳剂能够明显改善被布比卡因抑制的心肌细胞的活性^[1]。本研究通过流式细胞仪检测细胞凋亡实验发现,一定浓度的布比卡因作用于原代心肌细胞后会增加原代心肌细胞的凋亡率,而脂肪乳剂能够显著减轻这一效应,推测脂肪乳剂在逆转布比卡因心肌毒性作用中很可能与细胞的某些抗凋亡机制存在密切的关系。

通过对原代心肌细胞线粒体形态和膜电位的

研究发现,布比卡因可使心肌细胞线粒体发生损伤,使线粒体呈髓样或空泡样改变,造成线粒体膜电位的下降,而脂肪乳剂能够明显改善线粒体的形态结构和功能^[1]。Cyto-C 的释放是内源性凋亡途径中的主要步骤^[4],其与凋亡蛋白酶激活因子形成的 Cyto-C/凋亡蛋白酶激活因子凋亡体,促进 casepase-9 的自身活化,加速活化的 casepase-9 激活 casepase-3,形成活化的 casepase-3,导致细胞凋亡^[5,6]。本研究结果显示脂肪乳剂能够明显降低布比卡因引起的 Cyto-C 向胞质中的释放,并抑制细胞凋亡通路中 casepase-3 蛋白的活化,降低胞质中活化的 casepase-3 蛋白含量,提示影响原代心肌细胞线粒体凋亡途径是脂肪乳剂逆转布比卡因的心肌毒性可能机制之一。

本研究为了排除神经及体液因素因素的干扰,采用了心室肌的原代培养技术,运用细胞免疫组化法确定研究对象的纯度,并在提取细胞质蛋白过程中最大程度避免了细胞器内蛋白的干扰。通过对线粒体凋亡途径中特异性蛋白的测定,在蛋白质分子水平上探究了脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性的可能机制。这是对脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性机制的进一步研究,通过影响线粒体凋亡途径来实现对心肌细胞的保护,是脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性的可能机制之一。为深入研究脂肪乳剂逆转布比卡因心肌毒性的机制提供了一定的理论基础,也为更科学地指导临床用药提供了一定的参考。

参 考 文 献

- [1] 李振辉, 杨希营, 隗兆东, 等. 脂肪乳逆转布比卡因心肌细胞毒性中线粒体形态和膜电位的变化. 临床麻醉学杂志, 2015, 31(10): 1003-1006.
- [2] 吴丹, 冯健, 莫显刚, 等. 改良的乳小鼠心肌细胞原代培养方法. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4): 62-67.
- [3] Li L, Ye XP, Lu AZ, et al. Hyperglycemia magnifies bupivacaine-induced cell apoptosis triggered by mitochondria dysfunction and endoplasmic reticulum stress. J Neurosci Res, 2013, 91(6): 786-798.
- [4] Huttemann M, Lee I, Crossman LI, et al. The multiple functions of cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. Adv Exp Med Biol, 2012, 748: 237-264.
- [5] 郑天胜, 李翔. 线粒体凋亡通路的研究进展. 医学综述, 2013, 19(18): 3282-3285.
- [6] 梁予洁, 吉杰梅, 刘敬臣, 等. 神经节苷脂预处理对布比卡因诱导 N2a 神经细胞凋亡后 casepase-3 表达的影响. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(7): 688-691.

(收稿日期: 2016-11-03)