

丙泊酚对HepG2细胞基因表达差异的影响

赵京禹, 李平, 郭徽, 刘苏, 靳恒, 岳琦, 郝建华 (解放军总医院第一附属医院 麻醉科, 北京市 100037)

摘要: 目的 分别用新、旧两型丙泊酚处理HepG2细胞后, 筛选在HepG2细胞中存在表达差异的基因, 以研究其是否影响细胞代谢及其差异。方法 用新、旧两型丙泊酚及相应的脂肪溶剂处理HepG2细胞后, 提取mRNA逆转录为cDNA, 运用基因表达谱芯片方法分析差异表达的基因。结果 基因表达谱芯片分析发现, 旧型丙泊酚处理细胞后基因表达水平显著上调和下调的分别是88个和34个, 而新型丙泊酚处理细胞后基因表达水平显著上调和下调的分别是59个和14个。结论 筛选出新、旧两型丙泊酚处理HepG2细胞后差异表达的基因, 提示新剂型丙泊酚可能对细胞代谢影响更小, 并为相关的分子生物学机制研究提供了重要依据。

关键词: 丙泊酚; HepG2细胞; 差异表达基因

Effects of propofol on differentially expressed genes in HepG2 cells

ZHAO Jing-yu, LI Ping, GUO Hui, LIU Su, JIN Heng, YUE Qi, HAO Jian-hua (Department of anesthesiology, The First Affiliated Hospital of General Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To screen differential gene expression in HepG2 cells treated with new or old type propofol in order to assess the effects and differences in cell metabolism. **Methods** High quality mRNA and cDNA had been prepared and microarray screening had been conducted. Microarray gene expression profiling technique was applied to analyze the differentially expressed genes in HepG2 cells treated with new and old type propofol respectively. **Results** It was found that 88 genes were up-regulated and 34 genes were down-regulated in HepG2 cell line treated with old type propofol, while 59 genes were up-regulated and 14 genes were down-regulated in cell line treated with new type propofol. **Conclusions** cDNA microarray technology was successfully used to screen the differentially expressed genes in HepG2 cell line treated with new and old type propofol, which indicated the effect of new type propofol on the metabolism may be lower than the old type, and it showed us the clues for studying the relative molecular biology mechanism between propofol and metabolic diseases.

Key words: Propofol; HepG2 cell; Differential expression gene

丙泊酚因其起效快、苏醒迅速、不良反应少等特点已被广泛应用于临床各科手术麻醉和各种躁动的镇静治疗中。由于其溶剂为脂类, 人们担心其是否会影响脂类代谢过程。有报道提示大剂量、长时间输注丙泊酚后可能引起高脂血症、肝脏脂肪浸润; 也有研究表明大剂量长时间输注丙泊酚会增加患者的血清TG水平, 并引起脂类代谢

异常。而理论上, 应用高浓度丙泊酚可激活进入体内的脂类物质, 更适用于已存在脂代谢障碍的患者和肝功能尚未发育成熟的婴幼儿。

但随着我国糖尿病、脂肪肝及代谢综合征等代谢性疾病的发病率逐年增加, 公众的健康受到了较大危害。随着全静脉麻醉在国内外的认同和推广, 针对这些人群使用丙泊酚会不会对相关疾病存在一定影响, 甚至对具有潜在发病危险的患

基金项目: 吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金 (NO: 320.6750.07152)

通讯作者: 郝建华 Email: jameszhao304@163.com

者起诱发作用,都值得商榷和研究。

本研究应用基■芯片技术筛选新、旧两型内消酚对HepG2细胞差异表达的基■,研究其对细胞代谢可能存在的影响,并为相关的分子生物学机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 HepG2细胞系本实验室保存;细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂Trizol均购自Gibco公司,CO₂细胞孵育箱(美国BD公司)PTC200 PCR仪(MJ Research, Waltham, MA)。

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞的培养 细胞株用DMEM培养基(含有100 kU/L氨苄西林和100 ml/L小牛血清)常规培养,生长至80%~90%融合用于实验。

1.2.2 用不同剂量的丙泊酚处理HepG2细胞 在培养液中分别加入旧型、新型丙泊酚,至终浓度分别达到1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml,分别培养48小时。同时设未处理的对照组(对照组仅加入培养基)。

1.2.3 总RNA提取 将上述各组在35 mm培养皿中培养的HepG2细胞,用Trizol试剂一步法提取细胞总RNA,样品经分光光度计检测吸光度A值,琼脂糖凝胶电泳检测。

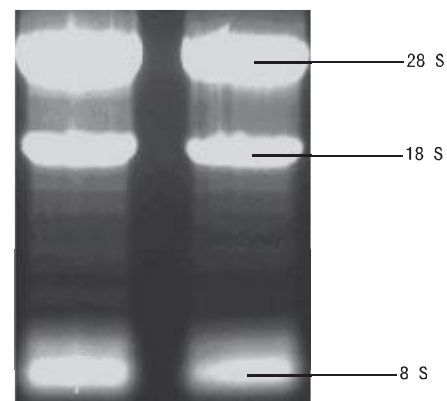
1.2.4 mRNA纯化、探针标记和芯片制备 以Qiagen公司Oligotex mRNA Midi试剂盒纯化得mRNA并行电泳检测,常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化。Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg),Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg)。乙醇沉淀后溶解于杂交液中。芯片包含的20 000个cDNA,由国家工程研究中心上海生物芯片有限公司提供,包括原癌基■和抑癌基■、免疫调节相关基■、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基■、信号转导相关基■等。以通用引物进行PCR扩增,靶基■溶解于3×SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2小时)、室温干燥(0.5小时)、UV交联、再分别用0.2% SDS、水及0.2%的硼氢化钠溶液处理10分钟,晾干备用。

1.2.5 杂交与洗涤 将基■芯片和杂交探针95℃水浴变性5分钟,将混合探针加在基■芯片上,置于60℃杂交15~17小时。SSC洗涤10分钟后室温晾干。

1.2.6 检测与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片。用预先选定的内参照基■对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。用ImaGene 3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度,计算Cy5/Cy3比值。阴性结果判断: Cy5/Cy3 > 1.8,为红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.6,为绿色荧光,显示表达减弱。

2 结果

2.1 总RNA提取 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,待细胞生长至对数期,在培养液中分别加入旧型、新型丙泊酚,至终浓度分别达到1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml,再培养48小时。使用Trizol试剂一步法提取细胞总RNA,琼脂糖凝胶电泳可见28 S、18 S及8 S条带,见图1。



■ 1 新型和旧型丙泊酚处理HepG2细胞后提取总RNA结果

注:左泳道为旧型丙泊酚处理HepG2细胞后提取总RNA结果;右泳道为新型丙泊酚处理HepG2细胞后提取总RNA结果

2.2 表达谱芯片聚类分析结果 对照组及旧型、新型丙泊酚处理组(不同浓度)表达谱芯片结果用Cluster 3.0软件进行聚类分析,见图2。

2.3 差异表达基■分析 旧型丙泊酚处理细胞后基■表达水平显著上调和下调的分别是88个和34

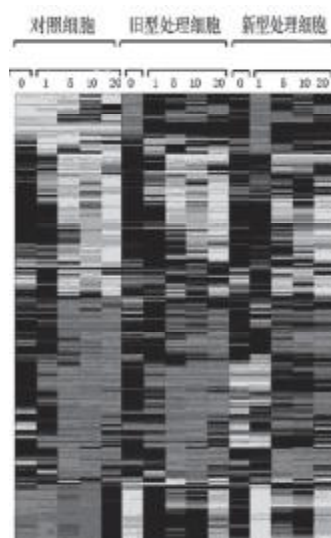


图2 各组细胞表达谱芯片结果

注：图中每组0泳道为对照组细胞（仅加入培养基）、以及培养液中分别加入旧型、新型丙泊酚（分别至终浓度达到1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml）后培养48小时，处理细胞提取RNA进行表达谱基因芯片检测后用cluster 3.0软件进行聚类分析结果

个；新型丙泊酚处理细胞后基因表达水平显著上调和下调的分别是59个和14个，其中与代谢密切相关基因均存在显著上调或下调的基因列表，见表1和表2。

3 讨论

丙泊酚主要成分异丙酚通过直接清除氧自由基、抑制脂质过氧化反应、调节细胞内钙离子平衡、降低组织氧耗等途径发挥抗氧化作用，从而对各重要器官（心、脑、肾、肝、骨骼肌等）缺血/再灌注损伤具有保护效应。曹云飞等^[1]研究认为异丙酚能有效抑制H₂O₂诱发的红细胞溶血和脂

质过氧化产物生成，对血红蛋白的氧化反应也有一定的抑制作用，因而具有抗氧化保护作用。但作为其赋形剂的脂类成分可同时成为脂质过氧化底物而降低异丙酚的抗氧化作用。理论上，提高异丙酚的浓度、降低进入体内的脂类含量则可提高异丙酚的抗氧化保护作用、扩大其在创伤急救中的应用^[2]。应用高浓度丙泊酚可激活进入体内的脂类物质，更适用于已存在脂代谢障碍的患者和肝脏功能尚未发育成熟的婴幼儿以及需要长期镇静的ICU患者等。但由于其溶剂为脂类，是否会导致脂代谢障碍尚存在争议。有报道提示^[3,4]大剂量、长时间输注丙泊酚后可能引起代谢性酸中毒、高脂血症、肝脏脂肪浸润和横纹肌溶解、难治性的心力衰竭等严重并发症，甚至导致死亡，即“丙泊酚输注综合征”（propofol infusion syndrome, PIS）^[5,6]。有报道丙泊酚临床剂量用于3小时以内的小儿手术麻醉虽能引起一过性血清TG水平升高，但无高甘油三酯血症及不安全的临床事件发生，因此在合理应用前提下，对于幼儿是较好的选择^[6]。以小剂量丙泊酚[1~4 mg/(kg·h)]的速度持续输注48小时，并未发现脂血症和酸中毒^[7]。但也有研究表明大剂量长时间输注会增加患者的血清TG水平，并引起脂类代谢异常^[8]。机体在应激状态下可能导致与血脂清除和代谢有关的酶系统的改变，使机体对脂肪代谢及清除能力下降，此时输入丙泊酚则加重了机体的脂肪负荷和代谢紊乱，可能导致高脂血症^[9]。输注丙泊酚时加入1%脂肪乳剂，易诱发高脂血症，尤其当输注时间超过7天时，血浆中的甘油三酯水平可达正常值的3~4

表1 表达显著增强的蛋白基因

序号	GenBank	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_182804.1	载脂蛋白B48受体 (Apo B48 receptor)	3.180
2	NM_000384.1	载脂蛋白B (Apo B)	2.841
3	NM_182804.1	人类载脂蛋白B48受体 (Homo sapiens apolipoprotein B48 receptor)	2.693
4	NM_020474.2	N-乙酰半乳糖胺- T1 (GalNAc-T1)	2.458
5	NM_000209.1	人类胰岛素启动子因子1 (Homo sapiens insulin promoter factor 1)	2.045

表 2 表达显著减弱的蛋白基因

序号	GenBank	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_003661.2	人类载脂蛋白L1 (Homo sapiens apolipoprotein L1)	0.479
2	NM_007193.3	人类膜联蛋白A10 (Homo sapiens annexin A10)	0.408
3	NM_183075.1	细胞色素P450 (Cytochrome P450)	0.450
4	NM_153486.2	乳酸脱氢酶D (lactic dehydrogenase D)	0.450

倍，停药后也需数天方可恢复正常。为避免甘油三酯升高，对接受肠外营养治疗的患者，在计算脂类需要量时，应将丙泊酚的热量考虑在内。

在现代社会，随着生活方式和生活结构的明显改变，主要是人体摄入能量过多、脂肪摄入比例增大、活动量减少致使肥胖或超重、血脂紊乱、糖耐量异常及高血压的患病率显著增加。这些成为一种因果关系的综合体，被称为代谢综合征（metabolic syndrome, MS）。MS已成为普遍存在于人类的一个现象，在我国MS的发病率为15.1%，已经成为威胁人体健康的重要因素。而肥胖、超重和（或）血脂紊乱的发生率则更是逐年大幅度增加。

在这种社会情况下，临床使用丙泊酚时，是否需要有针对性地用药，即对不同年龄、性别、种族人群的患者用药剂量及使用时间不同，以预防、避免可能发生的不利结果显得尤为重要。尤其是目前麻醉用药的趋势是全凭静脉麻醉，丙泊酚的使用更为广泛、用药量大、用药时间更长。因此，研究丙泊酚与人体脂代谢过程相关性及其机制就更突显其迫切性和重要性。

基因芯片技术具有强大的类比性、巨大的信息产出率、高度敏感性和专一性、高度重复性、微型化和自动化等优点。目前，基因芯片技术已广泛应用于多个领域，如基因组研究、临床疾病的基因诊断、后基因组计划、药物研究开发、法医学鉴定、生物信息学等。

本研究通过基因芯片技术，从20 000个基因中筛选出多个存在差异表达的基因，这些基因涉及细胞信号转导、物质代谢、肿瘤发生、细胞凋亡等多个领域。在脂类物质代谢方面，笔者发现

新、旧两型丙泊酚影响脂代谢相关基因的表达，对机体脂代谢有益，更有利于对脂类物质的转运及代谢。相比较而言，新型丙泊酚的影响更有利于机体脂类物质代谢。

由此，本研究中可以得出这样的结论：丙泊酚对脂代谢相关基因表达的影响有益于机体对脂类物质的转运及代谢；相比较而言，新型丙泊酚效果更佳。但是其如何导致基因表达水平的改变以及有利于机体对脂类物质代谢的机制尚不明确，有待深入研究。

参考文献

[1] 曹云飞, 薛惠斌, 俞卫锋. 异丙酚对红细胞膜基因表达的损伤保护作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2000, 16: 90-92.

[2] Hung YC, Lee EJ, Chen HY, et al. Effects of propofol sedation during the early postoperative period in hemorrhagic stroke patients[J]. Acta Anaesthesiol Taiwan, 2009, 47: 128-133.

[3] Türe H, Mercan A, Koner O, et al. The effects of propofol infusion on hepatic and pancreatic function and acid-base status in children undergoing craniotomy and receiving phenytoin[J]. Anesth Analg, 2009, 109: 366-371.

[4] Fujita Y, Ezura Y, Bujo H, et al. Association of nucleotide variations in the apolipoprotein B48 receptor gene (APOB48R) with hypercholesterolemia[J]. J Hum Genet, 2005, 50: 203-209.

[5] 林培容, 黄宁光. 长时间输注丙泊酚可能的风险—丙泊酚输注综合征[J]. 临床麻醉学杂志, 2004, 20: 250-252.

[6] 裴凌, 崔旭, 王俊科. 异丙酚静脉麻醉对小儿血脂的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2003, 23: 552-553.

[7] Bouvet L, Stoian A, Rimmelé T, et al. Optimal remifentanyl dosage for providing excellent intubating conditions when co-administered with a single standard dose of propofol[J]. Anaesthesia, 2009, 64: 719-726.

[8] Blum JM, Brunsfold ME. Non-acidotic propofol infusion syndrome[J]. Br J Anaesth, 2009, 103: 617-618.

[9] Han TH, Greenblatt DJ, Martyn JA. Propofol clearance and volume of distribution are increased in patients with major burns[J]. J Clin Pharmacol, 2009, 49: 768-772.

收稿日期：2009-02-17