



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos do pré-tratamento com propofol sobre a apoptose de células miocárdicas e expressão de SERCA2 em ratos com isquemia/reperfusão hepática



Shuzhen Yu^a, Yongqing Guo^{a,*}, Weiwei Zhang^a, Lina Zheng^a, Junming Ren^b, Jianmin Jin^a, Baofeng Yu^b, Yu Zhang^c, Hao Wang^c e Yuhong Zhang^c

^a Shanxi Provincial People's Hospital, Department of Anesthesiology, Taiyuan, China

^b Shanxi Medical University, Department of Biochemistry, Taiyuan, China

^c Shanxi People's Hospital, Department of General Surgery, Taiyuan, China

Recebido em 26 de setembro de 2016; aceito em 15 de junho de 2018

Disponível na Internet em 6 de setembro de 2018

PALAVRAS-CHAVE

Propofol;
Fígado;
Lesão de reperfusão;
Miocárdio;
Reticulo endoplasmático
Ca²⁺-ATPase2

Resumo

Introdução: A lesão hepática por isquemia-reperfusão é um processo fisiopatológico comum em cirurgias hepáticas. Mais estudos ainda são necessários para avaliar se o propofol pode reduzir a lesão de isquemia-reperfusão miocárdica induzida pela lesão de isquemia-reperfusão hepática em ratos, juntamente com os mecanismos que estão relacionados.

Objetivo: Investigar se propofol protege as células do miocárdio da apoptose com a lesão hepática por isquemia-reperfusão.

Métodos: Ratos machos da raça Sprague-Dawley ($n = 18$) foram alocados aleatoriamente em três grupos: Grupo Sham (Grupo S, $n = 6$), Grupo Lesão Hepática por Isquemia-reperfusão (Grupo IR, $n = 6$) e Grupo Propofol (Grupo P, $n = 6$). O Grupo S foi submetido apenas à laparotomia. O grupo IR foi submetido à isquemia por 30 min e reperfusão por 4 h. O grupo P foi submetido à mesma isquemia do grupo IR, com a administração de 120 mg.kg⁻¹ de propofol iniciada 10 min antes da isquemia, seguida de infusão contínua a 20 mg.kg⁻¹.h⁻¹. A apoptose celular foi examinada por meio do ensaio de marcação de terminações dUTP pela deoxinucleotidil transferase. Reticulo endoplasmático Ca²⁺-ATPase2 (SERCA2) e caspase-3 do ácido aspártico contendo cisteína (caspase-3 clivada) foram avaliados com o ensaio *western blot* e reação em cadeia da polimerase.

Resultados: A taxa de apoptose foi maior com mRNA e proteína de SERCA2 regulados para baixo e caspase-3 clivada suprarregulada no Grupo IR, em comparação com o Grupo S ($p < 0,01$). A taxa de apoptose foi menor com mRNA e proteína de SERCA2 suprarregulada e caspase-3 clivada sub-regulada no Grupo P, em comparação com o Grupo IR ($p < 0,01$).

* Autor para correspondência.

E-mail: yongqingguodoc@126.com (Y. Guo).

KEYWORDS

Propofol;
Liver;
Reperfusion injury;
Myocardium;
Endoplasmic
reticulum
Ca²⁺-ATPase2

Conclusões: O propofol pode reduzir a apoptose de células miocárdicas induzida por lesão hepática por isquemia-reperfusão. Entretanto, pode suprarregular o mRNA e a proteína de SERCA2 em ratos.

© 2018 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Effects of propofol pretreatment on myocardial cell apoptosis and SERCA2 expression in rats with hepatic ischemia/reperfusion

Abstract

Introduction: Hepatic ischemia-reperfusion injury is a common pathophysiological process in liver surgery. Whether Propofol can reduce myocardial ischemia-reperfusion injury induced by hepatic ischemia-reperfusion injury in rats, together with related mechanisms, still needs further studies.

Objective: To investigate if propofol would protect the myocardial cells from apoptosis with hepatic ischemia-reperfusion injury.

Methods: Male Sprague-Dawley rats ($n=18$) were randomly allocated into three groups: Sham Group (Group S, $n=6$), Hepatic Ischemia-reperfusion Injury Group (Group IR, $n=6$) and Propofol Group (Group P, $n=6$). Group S was only subjected to laparotomy. Group IR was attained by ischemia for 30min and reperfusion for 4h. Group P was subjected identical insult as in Group IR with the administration of propofol started 10min before ischemia with 120mg.kg⁻¹, following by continuous infusion at 20mg.kg⁻¹.h⁻¹. Cell apoptosis was examined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay. Endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase2 (SERCA2) and cysteine-containing aspartic acid cleaved-caspase3 (cleaved-caspase3) were assayed by western blot and Altimeter polymerase chain reaction.

Results: Apoptosis rate was increased, with mRNA and protein of SERCA2 down-regulated and cleaved-caspase3 up-regulated in Group IR compared with Group S ($p<0.01$). Apoptosis rate was decreased, with mRNA and protein of SERCA2 up-regulated and cleaved-caspase3 down-regulated in Group P compared with Group IR ($p<0.01$).

Conclusions: Propofol can reduce hepatic ischemia-reperfusion injury-induced myocardial cell apoptosis, meanwhile, can up-regulate mRNA and protein of SERCA2 in rats.

© 2018 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A isquemia-reperfusão hepática total é comumente encontrada na macrossecção central do tumor hepático ou na área do fígado, no tumor do lobo caudado e na ressecção hepática e no transplante ortotópico de fígado. Nos últimos anos, estudos relatam que a lesão de isquemia-reperfusão (I/R) hepática tem reação geral, pode afetar a função hepática e causar danos em órgãos distantes.¹⁻⁴ Os principais mecanismos podem ser derivados do aumento de radicais de oxigênio e da sobrecarga de cálcio nas células, o aumento de radicais de oxigênio é o fator mais importante.⁵⁻⁷ Como prevenir e curar a lesão hepática após I/R e as lesões secundárias a órgãos distantes são questões importantes a serem resolvidas.

Na perfusão pós-isquemia hepática da veia hepática para o átrio direito, o coração é o primeiro órgão a receber a perfusão sanguínea e o estágio inicial pode gerar danos. A sobrecarga de cálcio, a geração de radicais de oxigênio e a morte de células cardíacas são os

principais motivos que levam à lesão miocárdica causada por I/R.^{8,9} O estágio inicial da lesão de I/R hepática pode gerar uma grande quantidade de radicais de oxigênio⁷ que podem chegar aos tecidos musculares cardíacos via perfusão sanguínea. O radical oxigênio pode ativar peróxido em lipídios da membrana e levar ao aumento da permeabilidade da membrana miocárdica e agir diretamente sobre a Ca²⁺-ATPase2 no retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA2). O processo pode reduzir a função da SERCA2 ou inibir sua atividade, reduzir ainda mais a ingestão de Ca²⁺ e levar à sobrecarga de cálcio.¹⁰⁻¹² Uma grande quantidade de caspase-3 ativada pode levar à apoptose miocárdica.^{13,14}

Atualmente, o propofol tem sido amplamente aplicado na anestesia clínica e é o medicamento comum para estudar a proteção da lesão de isquemia-reperfusão. O propofol pode proteger órgãos distantes na isquemia-reperfusão hepática em ratos^{15,16} e este estudo teve como objetivo estimar o efeito do propofol sobre a apoptose miocárdica e seu mecanismo.

Material e métodos

Animais

Ratos machos Sprague-Dawley entre 200 e 230g foram comprados no *Experimental Animal Center* (número de licença: SCXK–Jun 2012-0004); os experimentos foram iniciados após uma semana de alimentação adaptativa com adequação de água e ração. Este estudo foi feito em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde. O protocolo de uso de animais foi revisado e aprovado pelo Comitê Institucional para o Uso e Cuidado de Animais (IACUC) da Universidade de Medicina de Shanxi.

Designação dos grupos

Os ratos ($n=18$) foram randomicamente alocados em três grupos: Grupo S ($n=6$), Grupo IR ($n=6$) e Grupo P ($n=6$).

Preparação do modelo de I/R nos ratos

Segundo estudos prévios,^{16,17} após a indução anestésica via injeção intraperitoneal de uretano a 25% (0,4 mL. 100 mg⁻¹), o rato foi preso com firmeza em supinação sobre a mesa cirúrgica, a pele abdominal foi raspada, o animal foi desinfetado e a cavidade abdominal foi aberta camada por camada. Uma micropinça vascular não invasiva foi então usada para fixar o pedículo do fígado para preparar o modelo de isquemia hepática total; 30 minutos (min) depois a perfusão foi recuperada. Para os ratos no Grupo S, o abdome foi aberto apenas para o *porta hepatis*, mas não foi ligado. O grupo IR foi preparado como o modelo de lesão hepática por IR total. Para o Grupo P, uma dose de carga de propofol (20 mg.kg⁻¹) foi injetada lentamente através da veia caudal 10 min antes da preparação do modelo e depois continuamente infundida a uma velocidade de 20 mg.kg⁻¹.h⁻¹, até a execução. Os demais procedimentos foram iguais aos do Grupo IR.

Coleta de amostras

Os ratos dos grupos IR e P foram mortos quatro horas (h) após a reperfusão e os ratos do Grupo S foram mortos 4h após a dissecação do *porta hepatis*. A cavidade torácica foi então aberta e o coração exposto; após o enxágue com solução salina, os ventrículos direito e esquerdo foram cortados ao longo do septo interventricular e os tecidos miocárdicos da parede ventricular esquerda foram rapidamente seccionados e armazenados a -80 °C para posterior detecção de apoptose em cardiomiócitos e exame de proteínas relacionadas. Os tecidos do lobo lateral esquerdo foram então amostrados para coloração com hematoxilina-eosina (HE) e as observações histopatológicas foram feitas com um microscópio de luz (com ampliação de 200×).

Detecção de apoptose em células miocárdicas pelo ensaio de marcação de Nicks por dUTP-biotina mediada por desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL)

Uma quantidade apropriada de tecido miocárdico foi usada para detectar apoptose com o kit de detecção de apoptose TUNEL (Beyotime Biotechnology Co. Ltd., Xangai, China), de acordo com as instruções do fabricante, sob um microscópio de luz (com ampliação de 200×).

Detecção de proteínas SERCA2 e caspase-3 clivada em tecidos miocárdicos por *western blot*

Proteínas teciduais totais foram extraídas de 100 mg de tecidos miocárdicos; albumina de soro bovino (Beyotime Biotechnology Co. Ltd., Xangai, China) foi usada como padrão proteico. Os teores de proteína foram então determinados com o método azul brilhante de Coomassie. Uma quantidade igual de amostra de proteína (50 µg) foi então separada com o uso de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 10% e transferida para uma membrana de nitrocelulose pelo método de transferência semiseco. Após o bloqueio com albumina de soro bovino a 3% por 2 h, o anticorpo SERCA2 diluído (1:1.000; Abcam Inc., EUA) e o anticorpo clivado da caspase-3 (1:1.000; Abcam Inc., EUA) foram adicionados às membranas e incubados durante a noite a 4 °C. Após lavagem com TBST (Tris-HCl, NaCl, Tween 20) (5 min × 3 x), o anticorpo secundário anti-IgG de coelho feito em cabra (H+L) (1:5.000) foi adicionado à membrana e incubado a 37 °C por 2 h. Esse processo foi seguido por lavagem com TBST (5 min × 3 x) e desenvolvimento com o kit de quimioluminescência BeyoECL Plus. O sistema de imagem em gel ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, EUA) foi usado para escaneamento e o *software* de análise Quantity One foi usado para detecção e análise da expressão de SERCA2 e caspase-3.

Detecção do mRNA de SERCA2 e caspase-3 clivada em tecidos miocárdicos por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do kit trizol (Invitrogen). O RNA foi então transcrito reversamente em cDNA com o uso do kit RT-PCR e o método de uma etapa para posterior amplificação por PCR; os produtos de amplificação por PCR foram então analisados por eletroforese em gel. O sistema de transcrição reversa foi usado com 2 µL do molde de RNA total (1 µg), 2 µL da mistura de dNTP, 2 µL de MgCl₂, mais EDPC e água destilada para 25 µL. Os parâmetros da reação foram os seguintes: pré-saturação a 95 °C por 5 min, desnaturação a 95 °C por 30s, anelamento a 58 °C por 30s e extensão a 72 °C por 30s, por 40 ciclos. Os iniciadores (*primers*) usados são apresentados na [tabela 1](#) (Sangon Biotech (Xangai) Co., Ltd., China).

Análise de dados

O *software* SPSS 13.0 foi usado para análise estatística. Os dados eram de distribuição normal e foram expressos em média ± desvio-padrão e as comparações intergrupos

Tabela 1 Promotores (*primers*) RT-PCR de SERCA, caspase-3 e GADPH

Gene	Primer (5'-3')
SERCA	For: GAGATCAGCTAGGTCAGCG Rev: GCATTGGTTACGCTGCTAG
Caspase-3	For: GGCATGGAGAACAACCTGAAAC Rev: GCGAATCTGTTTCTTTGCATG
GADPH	For: AGCCACATCGCTCAGACA Rev: TGGACTCCACGACGTACT

GADPH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; SERCA: retículo endoplasmático Ca^{2+} -ATPase2.

GADPH foi usado como referência interna. Primer (5'-3'): sequência da extremidade 5' para a extremidade 3'; For: *forward*; Rev: *reverse*.

foram feitas com Anova, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Coloração com HE (hematoxilina-eosina)

Os tecidos hepáticos do Grupo S não apresentaram infiltração de neutrófilos e as estruturas do fígado estavam claras e completas. Os tecidos hepáticos dos grupos IR e P apresentaram sinusoides hepáticos estreitos, edema evidente e degeneração vacuolar após 4 h de reperfusão. Os filetes de células hepáticas estavam desordenados com necrose local. As lesões das células hepáticas do Grupo P foram significativamente reduzidas em comparação com as do Grupo IR e a morfologia do fígado estava próxima ao normal, com congestão sinusoidal e ocasional infiltração de uma pequena quantidade de células inflamatórias.

Deteção de apoptose miocárdica por TUNEL

No Grupo IR, a taxa de apoptose aumentou significativamente, em comparação com a do Grupo S ($p < 0,01$ para todos). No Grupo P, a taxa de apoptose diminuiu significativamente, em comparação com a do Grupo IR ($p < 0,01$ para todos), conforme demonstrado na [figura 1](#) e [tabela 2](#).

Deteção de proteínas de SERCA2 e caspase-3 clivada

A expressão da proteína de SERCA2 foi significativamente sub-regulada no Grupo IR, em comparação com o Grupo S,

Tabela 2 Determinação da taxa de apoptose de células miocárdicas em cada grupo

Grupo	Taxa de apoptose de células miocárdicas
Grupo S (n=6)	2,06 ± 0,89
Grupo IR (n=6)	33,06 ± 3,09 ^a
Grupo P (n=6)	19,26 ± 1,62 ^b

^a $p < 0,01$ comparado com o Grupo S.

^b $p < 0,01$ comparado com o Grupo IR.

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

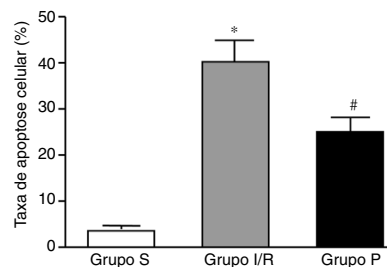


Figura 1 Deteção de apoptose miocárdica. Grupo IR: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão hepática, obtida com isquemia por 30 min e reperfusão por 4 h. Grupo P: grupo propofol, submetido à isquemia idêntica à do Grupo IR, com a administração de propofol iniciada 10 min antes da isquemia com 20 g.kg^{-1} , seguida de infusão contínua a $20 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Grupo S: grupo *sham*; Grupo IR: grupo isquemia-reperfusão; Grupo P: grupo propofol.

* $p < 0,01$: comparado com o Grupo S; # $p < 0,01$: comparado com o grupo IR.

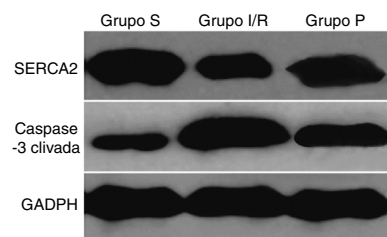


Figura 2 Deteção das proteínas SERCA2 e caspase3 clivada em cada grupo. Grupo IR, grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão hepática, obtida com isquemia por 30 min e reperfusão por 4 h. Grupo P, grupo propofol, submetido à isquemia idêntica à do Grupo IR, com a administração de propofol iniciada 10 min antes da isquemia com 20 g.kg^{-1} , seguida de infusão contínua a $20 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. SERCA2: retículo endoplasmático Ca^{2+} -ATPase2; GADPH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Grupo S, grupo *sham*; Grupo IR, grupo isquemia-reperfusão; Grupo P, grupo propofol. GADPH foi usado como referência interna.

mas a proteína da caspase-3 clivada foi significativamente suprarregulada ($p < 0,01$ para todos). SERCA2 foi significativamente suprarregulada no Grupo P, em comparação com o grupo IR, mas a caspase-3 clivada foi significativamente sub-regulada no Grupo P ($p < 0,01$ para todos), conforme demonstrado na [figura 2](#) e [tabela 3](#).

Tabela 3 Determinação das proteínas de SERCA2 e caspase-3 clivada em cada grupo

Grupo	SERCA2/GADPH	Caspase-3 clivada/GADPH
Grupo S (n=6)	1,12 ± 0,058	0,33 ± 0,032
Grupo IR (n=6)	0,54 ± 0,010 ^a	0,99 ± 0,058 ^a
Grupo P (n=6)	0,93 ± 0,027 ^b	0,70 ± 0,053 ^b

^a $p < 0,01$ comparado com o Grupo S.

^b $p < 0,01$ comparado com o Grupo IR.

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Tabela 4 Determinação do mRNA de SERCA2 e caspase-3 clivada em cada grupo

Grupo	SERCA2/GAPDH	Caspase-3 clivada/GAPDH
Grupo S (n=6)	1,10 ± 0,11	0,46 ± 0,033
Grupo IR (n=6)	0,57 ± 0,052 ^a	0,98 ± 0,063 ^a
Grupo P (n=6)	0,95 ± 0,092 ^b	0,65 ± 0,056 ^b

^a $p < 0,01$ comparado com o Grupo S.

^b $p < 0,01$ comparado com o Grupo IR.

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Detecção de mRNA de SERCA2 e caspase-3 clivada

Em comparação com o Grupo S, o mRNA de SERCA2 foi significativamente sub-regulado no Grupo IR, mas a caspase-3 clivada o mRNA foi significativamente suprarregulado ($p < 0,01$ para todos). Em comparação com o Grupo IR, o mRNA de SERCA2 foi significativamente suprarregulado no subgrupo P, mas a caspase-3 clivada foi significativamente sub-regulada no Grupo P ($p < 0,01$ para todos), conforme demonstrado na [tabela 4](#).

Discussão

A caspase-3 é um membro importante na execução de apoptose da família caspase, é necessária para a resposta em cascata de protease apoptótica. Uma vez ativada, a apoptose não será evitada e é a enzima efetora e a protease-chave no processo de apoptose como índice sensível e principal fator de efetividade na apoptose celular. Portanto, o nível de expressão da caspase-3 pode ser usado para estimar a situação da apoptose celular.

Com base em modelo de rato para indução de I/R segundo Goldhaber et al.,¹¹ este estudo teve como objetivo detectar a taxa de apoptose de miócitos cardíacos com o método TUNEL e compreender a expressão da caspase-3 clivada com os métodos *western blot* e PCR. Descobrimos que a taxa de apoptose de miócitos cardíacos foi maior no Grupo IR do que no Grupo S e que as expressões de mRNA e proteína da caspase-3 clivada foram obviamente suprarreguladas, indicaram que o modelo de lesão de isquemia-reperfusão do miocárdio foi construído com sucesso. No experimento primário, a maior taxa de apoptose foi detectada com 4h de reperfusão, causou sérios danos patológicos. Portanto, selecionamos os índices relevantes a 4h de reperfusão. De acordo com o tempo e a dose administrada da droga,¹⁶ descobrimos que as taxas de apoptose no Grupo P foram menores do que as do Grupo IR e houve menos expressão de proteína e mRNA da caspase-3 clivada com os métodos de coloração com HE, TUNEL, *western blot* e PCR. Esses resultados implicam que propofol pode reduzir a apoptose miocárdica por I/R do fígado em ratos, resultados semelhantes aos observados por Gao et al.¹⁶ e Jin et al.¹⁷

A sobrecarga de cálcio intracelular desempenha um papel importante no desencadeamento de lesão de I/R do miocárdio e melhora a taxa de apoptose de miócitos cardíacos;¹⁸⁻²⁰ inibir a sobrecarga de cálcio pode reduzir significativamente o dano miocárdico causado por I/R.²¹ O retículo sarcoplasmático é o principal local de captação, reserva e

liberação de Ca^{2+} ; SERCA2 pode manter baixo o nível de Ca^{2+} pela transmissão intracitoplasmática de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático. Talukder et al.²² indicaram que uma expressão mais elevada de SERCA2 pode aumentar a captação de Ca^{2+} , reduzir a sobrecarga de cálcio e, consequentemente, reduzir a lesão de I/R do miocárdio. Propofol pode ajustar a homeostase do cálcio intracelular e reduzir a apoptose miocárdica.²³ A expressão da SERCA2 pode refletir indiretamente a concentração de Ca^{2+} intracelular pela detecção de Ca^{2+} no tecido muscular cardíaco. Comparado com o Grupo S, a expressão de SERCA2 no Grupo I/R foi menor e a taxa de apoptose maior; na comparação com o Grupo I/R, a SERCA2 no Grupo P estava aumentada e a taxa de apoptose reduzida. Todos esses resultados indicam que propofol pode inibir a sobrecarga de cálcio pelo aumento da expressão de SERCA2 e, consequentemente, reduzir a apoptose do miocárdio causada por I/R.

Em resumo, a isquemia-reperfusão hepática total pode levar à apoptose do miocárdio em ratos, propofol pode reduzir a apoptose miocárdica induzida por isquemia-reperfusão hepática e o principal mecanismo pode ser a suprarregulação da expressão de SERCA2, que inibe a sobrecarga de cálcio. Mais detalhes sobre o mecanismo devem ser investigados em estudos adicionais que avaliem a concentração intracelular de Ca^{2+} .

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Science and Technology Projects of Shanxi Health Planning Commission (n° 201-201-055).

Este estudo foi feito em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde. O protocolo de uso de animais foi revisado e aprovado pelo Comitê Institucional para o Uso e Cuidado de Animais (IACUC) da Universidade de Medicina de Shanxi.

Referências

- Miranda LE, Capellini VK, Reis GS, et al. Effects of partial liver ischemia followed by global liver reperfusion on the remote tissue expression of nitric oxide synthase: lungs and kidneys. *Transplant Proc.* 2010;42:1557-62.
- Yang JC, Wang ZW, Li CL, et al. Multiple organ injury at early stage of intestinal and hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J First Mil Med Univ.* 2004;24:198-201.
- Magan AA, Khalil AA, Ahmed MH. Terlipressin and hepatorenal syndrome: what is important for nephrologists and hepatologists. *World J Gastroenterol.* 2010;16:5139-47.
- Cash WJ, McConville P, McDermott E, et al. Current concepts in the assessment and treatment of hepatic encephalopathy. *QJM.* 2010;103:9-16.
- Weinbroun AA, Hochhauser E, Rudick V, et al. Multiple oxygen dysfunction after remote circulatory arrest; common pathway of radical oxygen species. *J Trauma.* 1999;47:691-8.
- Omar MA, Wang L, Clanachan AS. Cardioprotection by GSK-3 inhibition: role of enhanced glycogen synthesis and attenuation of calcium overload. *Cardiovasc Res.* 2010;86:478-86.

7. Arai S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2003;10:189–94.
8. Chen H, Lei ZL, Han SJ, et al. Protective effects of propofol on renal injury during liver ischemia/reperfusion. *Med J Chin PAPF*. 2009;20:15–7.
9. Lotz C, Ping P, Kehl F. Letter by Lotz regarding article, "Reactive oxygen species-induced stimulation of 5' AMP-activated protein kinase mediates sevoflurane-induced cardioprotection". *Circulation*. 2010;121:e399–400.
10. Kendzari DE, Tchong JE. Double negatives. *Am Heart J*. 2003;145:9–11.
11. Goldhaber JL, Qayyum MS. Oxygen free radicals and excitation-contraction coupling. *Antioxid Redox Signal*. 2000;2:55–64.
12. Yoshiki U, Yoshiyuki A, Kosuke M, et al. Endothelin-1 prolongs intracellular calcium transient decay in neonatal rat cardiac myocytes. *Heart Vessels*. 2012;27:98–105.
13. Sun GB, Sun H, Meng XB, et al. Aconitine-induced Ca^{2+} overload causes arrhythmia and triggers apoptosis through p38 MAPK signaling pathway in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;279:8–22.
14. Chang G, Zhang D, Liu J, et al. Exenatide protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by improving mitochondrial function in H9c2 cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239:414–22.
15. Lu B, Zhao JL, Niu JC, et al. Effect of propofol on myocardial injury induced by hepatic ischemia/reperfusion in rats and the role of PI3K/Akt signaling pathway. *Chin J Anesthesiol*. 2010;30:1250–3.
16. Gao WZ, Dan L, Tian ZD, et al. Effects of propofol on lung injury and PI3K/Akt pathway in rats after liver ischemia and reperfusion. *Chin J Pathol*. 2013;29:488–92.
17. Jin YC, Kim W, Ha YM, et al. Propofol limits rat myocardial ischemia and reperfusion injury with an associated reduction in apoptotic cell death in vivo. *Vascul Pharmacol*. 2009;50:71–7.
18. Cheng YS, Chen Y, Li D. The mechanism and research status of calcium overload in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Chinese Med Innov*. 2013;10:150–2.
19. Zhu N, Yao RL, Liu JS, et al. The regulation of the apoptosis and oxidative stress of myocardial apoptosis and oxidative stress in rat limb ischemia/reperfusion. *Chin J Gerontol*. 2015;35:6666–8.
20. Talukder MA, Yang F, Nishijima Y, et al. Reduced SERCA2a converts sub-lethal myocardial injury to infarction and affects postischemic functional recovery. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46:285–7.
21. Zhang MH, Yin YQ, He HY, et al. Effects of dioscin on calcium channels in rat ventricular cardiomyocytes. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*. 2011;27:23–6.
22. Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zhao X, et al. Expression of SERCA isoform with faster Ca^{2+} transport properties improves postischemic cardiac function and Ca^{2+} handling and decreases myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H2418–28.
23. Kim HS, Chang WC, Hwang KC, et al. Effect of propofol on calcium homeostasis in hypoxia-reoxygenated neonatal rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*. 2008;594:139–45.