

右美托咪定预处理对大鼠肺缺血-再灌注损伤时氧化应激反应及细胞凋亡的影响*

孔岚¹,白玉¹,韩圣娜²

(1.郑州大学附属肿瘤医院麻醉科,郑州 450008;2.郑州大学基础医学院药理学教研室,郑州 450002)

摘要 目的 观察右美托咪定预处理对大鼠肺缺血-再灌注损伤时氧化应激反应及细胞凋亡的影响。方法 将 48 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组($n=16$),假手术组(S 组)开左胸不夹闭肺门,缺血-再灌注(IR)组夹闭左肺门使左肺缺血 45 min,再恢复灌注 2 h;右美托咪定预处理+缺血-再灌注组(D 组)夹闭左肺门前 20 min 经股静脉注射右美托咪定 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。再灌注 2 h 后处死大鼠,留取左肺组织,称重湿(W)和干重(D),测定 W/D 及总肺水含量(TLW),光镜观察肺组织形态学改变。黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量,Western blotting 检测肺组织 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(bcl-2)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 x 蛋白(bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达情况。结果 与 S 组比较,其他两组 W/D、TLW 均升高($P<0.01$);与 IR 组比较,D 组 W/D、TLW 明显降低($P<0.01$);与 S 组比较,其他两组肺组织 MDA 含量升高,SOD 活性降低($P<0.01$),肺组织 bax、caspase-3 蛋白表达升高($P<0.01$),bcl-2 蛋白表达降低($P<0.01$);与 IR 组比较,D 组 MDA 含量降低,SOD 活性升高更明显($P<0.01$),肺组织 bax、caspase-3 蛋白表达降低及 bcl-2 蛋白表达升高更显著($P<0.01$)。结论 右美托咪定通过抑制氧化应激反应及细胞凋亡减轻大鼠肺缺血-再灌注损伤。

关键词 右美托咪定;预处理;缺血-再灌注损伤/肺

中图分类号 R971.2;R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2019)03-0317-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.03.007

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Effect of Dexmedetomidine Pretreatment on Oxidative Stress Response and Apoptosis During Lung Ischemia-reperfusion in Rats

KONG Lan¹, BAI Yu¹, HAN Shengna² (1. Department of Anesthesiology, the Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 2. Department of Pharmacology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT Objective To evaluate the effects of dexmedetomidine on oxidative stress response and apoptosis during lung ischemia-reperfusion (IR) in rats. **Methods** Forty-eight adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n=16$ each) using a random number table: sham operation group (group S), group IR, and dexmedetomidine pretreatment+IR group (group D). Dex medetomidine was injected at $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 20 min before ischemia in Dex group. The equal volume of 0.9% sodium chloride solution was injected into groups and group IR, respectively. Rats were euthanized 2 h after reperfusion. The left lung tissue was extracted. Wet lung weight and dry lung weight (W/D) and total lung water content (TLW) were tested. Morphology of lung tissue was observed. The left lung tissues were removed for determination of malondialdehyde (MDA) content (by thiobarbituric acid method) and superoxide dismutase (SOD) activity (using xanthine oxidase method). The bcl-2, bax and Caspase-3 protein expression was detected by Western blotting. **Results** Compared with group S, W/D and TLW of the lung tissue in the other two groups were all significantly increased ($P<0.01$). Compared with group IR, W/D and TLW of the lung tissues in group D were all significantly reduced ($P<0.01$). As compared with group S, MDA was increased and SOD decreased, bax and Caspase-3 protein expression increased, bcl-2 protein expression decreased in the lung tissue of the other two groups ($P<0.01$). As compared with group IR, MDA decreased and SOD increased more significantly in group D ($P<0.01$), bax and Caspase-3 protein expression decreased and bcl-2 increased more significantly ($P<0.01$). **Conclusion** Dexmedetomidine can alleviate lung IR injury in rats, and the mechanism is related to inhibition of oxidative stress response and apoptosis.

KEY WORDS Dexmedetomidine; Pretreatment; Ischemia-reperfusion injury/lung

肺缺血-再灌注损伤是造成急性肺损伤的常见原因,多见于失血性休克、肺移植、体外循环手术、心脏骤停复苏等。研究表明,肺组织氧化应激反应和细胞凋亡与肺缺血-再灌注损伤的发生发展密切相关^[1],右美托咪定是高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂,有研究显示该药可减轻大鼠肺缺血-再灌注损伤^[2-3],但机制

尚不明确。笔者在本实验研究右美托咪定预处理对大鼠肺缺血-再灌注损伤的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级 SD 大鼠,2 个月龄,雄性,体质量 240~300 g,由郑州大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(豫) 2017-0009,实验动物合格

证号: HG0016。饲养环境:屏障环境,相对湿度 40%~70%,温度 20~26℃,人工光照,昼夜明暗交替,空气洁净度 10 000 级,落下细菌数 \leq 每皿 3 个,噪声 \leq 60 dB,自由摄食、饮水,建模前 12 h 禁食,本研究已获得郑州大学附属肿瘤医院动物伦理委员会批准同意。

1.2 药品与试剂 右美托咪定(江苏恩华药业股份有限公司,批号:20170702,规格:1 mL:100 μ g);丙二醛(MDA)试剂盒(批号:1508)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:1672)均购自南京建成科技有限公司;肝素钠(南京新百药业有限公司,批号:H32035851,规格:2 mL:12500 U),B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白(B cell lymphoma/leukemia-2 associated X protein, bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, bcl-2)、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3(cysteine specific proteinase-3, caspase-3)及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(中国碧云天生物技术研究,批号分别为 C1256, C1305, C1375, C1298),二抗工作液(中国碧云天生物技术研究,批号:SC6753, SC7876, SC8562, SC5219)。

1.3 仪器与设备 HX-100E 小动物呼吸机(中国成都泰盟科技有限公司),电泳仪(美国 Bio-rad 公司)。

1.4 动物分组与模型的制备 采用随机数字表法将大鼠分为 3 组($n=16$),假手术组(S 组)只开左胸不夹闭肺门;缺血-再灌注(IR)组夹闭左肺门使左肺缺血 45 min,再恢复灌注 2 h;右美托咪定预处理+缺血-再灌注组(D 组)夹闭左肺门前 20 min 经股静脉注射右美托咪定 20 μ g \cdot kg $^{-1}$ 。参照改良的 EPPINGER 法^[4]建立肺缺血-再灌注模型,大鼠经腹腔注射 10%水合氯醛 3 mL \cdot kg $^{-1}$ 麻醉,置于有保温设备的实验台上仰卧位固定,气管切开后插管,接小动物呼吸机,机械通气,潮气量双侧肺通气 15~20 mL \cdot kg $^{-1}$,单侧肺通气 8~10 mL \cdot kg $^{-1}$,通气频率 60 次 \cdot min $^{-1}$,吸气与呼气比为 1:2。维持呼气末二氧化碳分压(end tidal carbon dioxide tension, PETCO₂)4.66~5.98 kPa,股静脉置入 24 G 静脉留置针,便于给药和输液。修剪左胸部皮毛,涂抹脱毛剂去毛,75%乙醇、碘酊消毒左胸部皮肤,逐步分离肌肉、筋膜,切断肋骨后打开胸腔,暴露左肺,

无损伤钳游离左肺门,静脉注入肝素钠 50 U,10 min 后用无创血管夹夹闭左肺门 45 min,可见左肺颜色从红色变为暗红色,说明缺血成功,45 min 后松开血管夹恢复血供,左肺由暗紫色转为红色,表明再灌注成功。再灌注 2 h 后处死大鼠,留取左肺组织。制备模型过程中使用 BWZ-50C6 微量泵(浙江史密斯医学仪器有限公司)静脉泵注乳酸钠林格液 6 mL \cdot kg $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ 。

1.5 测定大鼠肺组织湿/干重比(Wet/Dry, W/D)以及总肺含水量(total lung water, TLW) 处死大鼠,取左肺组织,用 0.9%氯化钠溶液充分漂洗,多余水分用滤纸吸干,称重量即为湿重(W);80℃恒温箱中烘干 48 h,称干重(D),计算肺 W/D。TLW=(W-D)/D。另取部分左肺组织置于甲醛溶液,石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察、比较各组肺组织病理学特征。

1.6 肺组织 MDA 含量和 SOD 活性测定 取部分左肺组织,制备 10%组织匀浆,低温离心后取上层悬液,硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。

1.7 Western blotting 测定 bax、caspase-3、bcl-2 蛋白表达 取部分肺组织,研磨为组织匀浆,高速低温离心,取上清液,采用 Bradford 法测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性,聚丙烯酰胺凝胶电泳法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭,37℃反应后分别加入 bax、caspase-3、bcl-2 一抗和 GAPDH 一抗 4℃下过夜,加入二抗室温下反应 1.5 h。化学发光、显影、定影。Quantity One 图像分析软件进行半定量分析。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 版统计学软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用重复测量设计的方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 W/D 与 TLW 与 S 组比较,其他两组 W/D 升高,差异有统计学意义($F=98.152, 94.131, P<0.01$),TLW 均升高,差异有统计学意义($F=96.172, 92.386, P<0.01$);与 IR 组比较,D 组 W/D、TLW 明显降低,差异有统计学意义($F=105.163, 101.231, P<0.01$)。见表 1。

2.2 肺组织结构 S 组大鼠肺组织结构未见明显损伤性改变,肺泡及肺泡壁结构完整,肺间质无水肿,无中性粒细胞浸润;IR 组肺泡结构破坏严重,肺泡内及肺泡壁充血实变,肺间隔增厚,肺泡腔和间质严重水肿,并可见大量红细胞漏出,中性粒细胞明显浸润。D 组肺组织损伤程度明显减轻,肺泡及肺间质仅少量中

收稿日期 2018-04-21 修回日期 2018-05-22

基金项目 * 河南省基础与前沿技术研究项目 (172300410163)

作者简介 孔岚(1971-),女,河南郑州人,主任医师,硕士,研究方向:临床麻醉及麻醉药理。ORCID:0000-0003-4049-1935, E-mail:1976771161@qq.com。

性粒细胞浸润。

表 1 3 组肺组织 W/D 与 TLW 测定结果

Tab.1 Results of W/D and TLW of lungs in three groups

组别	大鼠数	W/D	TLW
S 组	16	4.31±0.28	3.29±0.26
IR 组	16	5.99 ±0.41 ^{*1}	4.71±0.39 ^{*1}
D 组	16	5.30±0.12 ^{*1*2}	4.23±0.21 ^{*1*2}

与 S 组比较, ^{*1}*P*<0.01; 与 IR 组比较, ^{*2}*P*<0.01

Compared with S group, ^{*1}*P* < 0. 01; Compared with IR group, ^{*2}*P*<0.01

2.3 肺组织 MDA 含量及 SOD 活性比较 与 S 组比较,其他两组肺组织 MDA 含量升高,差异有统计学意义($F=91.769, 95.832, P<0.01$);SOD 活性降低,差异有统计学意义($F=104.335, 97.356, P<0.01$);与 IR 组比较,D 组肺组织 MDA 含量降低($F=95.534, P<0.01$),SOD 活性升高,差异有统计学意义($F=96.769, P<0.01$),见表 2。

表 2 3 组大鼠肺组织 MDA 含量与 SOD 活性测定结果

Tab.2 Results of MDA content and SOD activity of lungs in three groups of rats

组别	大鼠数	MDA/ (nmol · mg ⁻¹)	SOD/ (U · mg ⁻¹)
S 组	16	0.372±0.019	112±5
IR 组	16	0.671±0.036 ^{*1}	61±6 ^{*1}
D 组	16	0.536±0.059 ^{*1*2}	75±8 ^{*1*2}

与 S 组比较, ^{*1}*P*<0.01; 与 IR 组比较, ^{*2}*P*<0.01

Compared with S group, ^{*1}*P* < 0. 01; Compared with IR group, ^{*2}*P*<0.01

2.4 肺组织 bax、caspase-3、bcl-2 蛋白表达比较 与 S 组比较,其他两组肺组织 bax 蛋白表达升高,差异有统计学意义($F=102.535, 99.765, P<0.01$),caspase-3 蛋白表达升高($F=103.325, 95.126, P<0.01$),bcl-2 蛋白表达降低($F=98.635, 95.396, P<0.01$),差异有统计学意义;与 IR 组比较,D 组肺组织 bax、caspase-3 蛋白表达降低($F=97.215, 94.156, P<0.01$),bcl-2 蛋白表达升高($F=106.235, P<0.01$),差异有统计学意义,见表 3。

3 讨论

肺缺血-再灌注损伤是临床常见问题,也是急性肺损伤的主要原因之一。预防和减轻肺缺血-再灌注损伤一直是临床研究热点。右美托咪定是一种高选择性

表 3 3 组大鼠肺组织 bax、caspase-3、bcl-2 蛋白表达情况

Tab.3 Protein expression of bax, caspase-3 and bcl-2 of lungs in three groups of rats

组别	大鼠数	bax	caspase-3	bcl-2
S 组	16	98.76±12.37	99.98±13.16	99.85±11.02
IR 组	16	234.12±26.35 ^{*1}	197.75±21.08 ^{*1}	38.67±5.18 ^{*1}
D 组	16	172.23±16.87 ^{*1*2}	143.79±14.25 ^{*1*2}	68.91±7.76 ^{*1*2}

与 S 组比较, ^{*1}*P*<0.01; 与 IR 组比较, ^{*2}*P*<0.01

Compared with S group, ^{*1}*P* < 0. 01; Compared with IR group, ^{*2}*P*<0.01

α₂-肾上腺素受体激动药,目前已发现其对缺血-再灌注所引起的脏器损伤具有良好的保护作用,机制与抗氧化应激、抑制炎症细胞因子释放以及抗细胞凋亡等有关^[5-6]。目前临床围术期右美托咪定多预先给药,因此本研究亦采用右美托咪定预处理方式,以更接近临床实践。笔者根据相关报道选取右美托咪定浓度^[7],即于缺血前 20 min 给予右美托咪定 20 μg · kg⁻¹。笔者在本研究采用改良 EPPINGER^[4]法建立大鼠肺缺血-再灌注模型,结果显示,IR 组肺组织 W/D、TLW 均升高,肺组织形态、结构均发生明显损伤性改变,提示大鼠肺缺血-再灌注损伤模型制备成功。D 组肺组织病理损伤明显轻于 IR 组,提示右美托咪定能减轻肺组织损伤。

组织器官发生缺血-再灌注时,体内氧自由基生成增多,膜磷脂中多不饱和脂肪酸与氧自由基发生脂质过氧化反应,产生大量有毒脂质过氧化产物,造成并加重组织损伤^[8-11]。SOD 是体内最主要的抗氧化酶和自由基清除剂,可以将脂质过氧化产物(如 MDA 等)歧化为过氧化氢和水,清除氧自由基并终止自由基病理性连锁反应,保护细胞免受损伤,其活性高低可反映机体清除氧自由基的能力^[12]。MDA 含量可直接反映机体脂质过氧化反应的程度,间接反映细胞损伤的程度^[13]。本研究中,与 S 组比较,IR 组肺组织 MDA 含量明显升高,SOD 活性明显降低,说明大鼠肺缺血-再灌注损伤过程有氧化应激反应参与;D 组肺组织 MDA 含量明显较 IR 组降低,SOD 活性明显较 IR 组升高,提示右美托咪定可能通过抑制氧化应激反应减轻大鼠肺缺血-再灌注损伤。

研究表明,在 IR 损伤中,细胞凋亡是再灌注后炎症反应和组织损伤的重要因素^[14]。因此细胞凋亡在肺缺血-再灌注损伤中具有重要作用^[15]。bcl-2 和 bax 对调节细胞凋亡非常重要,bcl-2 使细胞色素 C 释放减少,具有抑制细胞凋亡作用,bcl-2 介导的抑制凋亡作用能被 bax 所拮抗,两者处于平衡状态。缺血-再灌注

会影响细胞中这种平衡,导致细胞色素 C 大量释放进入胞质,引起细胞 caspase 凋亡途径被激活,发生细胞凋亡、组织功能损伤^[16]。本研究中,与 S 组比较,IR 组大鼠肺组织 bax、caspase-3 表达量升高明显,bcl-2 表达降低明显,提示缺血-再灌注可造成肺组织细胞过度凋亡。D 组大鼠肺组织 bax、caspase-3 表达量明显较 IR 组低,bcl-2 表达量明显较 IR 组高。提示右美托咪定可以抑制细胞凋亡。

总之,右美托咪定可以通过抑制氧化应激反应及细胞凋亡来减轻大鼠肺缺血-再灌注损伤。

参考文献

- [1] DENG C,ZHAI Z,WU D,et al.Inflammatory response and pneumocyte apoptosis during lung ischemia-reperfusion injury in all experimental pulmonary thromboembolism model [J].Thromb Thrombolysis,2015,40(1):42-53.
- [2] 万占海,张红,冷玉芳,等.右美托咪定对大鼠肺缺血再灌注损伤的影响[J].中华麻醉学杂志,2014,34(9):1066-1068.
- [3] KONISHI T.Brain oxidative stress as basic target of antioxidant traditional oriental medicines [J].Neurochem Res,2009,34(4):711-715.
- [4] EPPINGER M J,JONES M L,DEEB M,et al. Pattern of injury and the role of neutrophil in reperfusion injury in the rat lung[J].Surg Res,1995,58(6):276-280.
- [5] JIANG L,LI L,SHEN J,et al.Effect of dexmedetomidine on lung ischemia-reperfusion injury I [J].Mol Med Rep,2014,9(2):419-426.
- [6] CAI Y,XU H,YAN J,et al.Molecular targets and mechanism of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury [J].Mol Med Rep,2014,9(5):1542-1550.
- [7] GU J,CHEN J,XIA P,et al.Dexmedetomidine attenuates remote lung injury induced by renal ischemia-reperfusion in mice [J].Acta aesthesiol Scand,2011,55(10):1272-1278.
- [8] HE F,XU B L,CHEN C,et al. Methylophipogonanone A suppresses ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis in mice via activating P13K/Akt/eNOS signaling pathway [J].Acta Pharmacol Sin,2016,37(6):763-771.
- [9] FANG J,HU F,KE D,et al.N-dimethylsphingosine attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by recruiting regulatory T cells through P13K/Akt pathway in mice [J].Basic Res Cardiol,2016,111(3):32-34.
- [10] 张引,金世云,何淑芳,等.JNK 信号通路和 p38MAPK 信号通路在吗啡预处理减轻心力衰竭大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J].中华麻醉学杂志,2016,36(2):219-222.
- [11] STOOPS W W,HATTON K W,LOFWALL M R,et al. Intravenous oxycodone,hydrexidone,and morphine in recreational opioid users: abuse potential and relative potencies [J].Psychopharmacology (Berl),2010,212(2):193-203.
- [12] 王英,谢平,张琳,等.P13K/Akt/GSK.3B 信号通路在二氮嗪后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用:离体实验 [J].中华麻醉学杂志,2014,34(10):1237-1240.
- [13] 刘春伟,丛洪良,于雪芳,等.P13K-Akt、mTOR-KATP 通道及 mPTP 在阿托伐他汀后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J].天津医药,2015,43(1):46-50.
- [14] HATCHER H C,TESFAY L,TORTI S V,et al. Cytoprotective effect of ferritin in renal ischemia reperfusion injury [J].PLoS One,2015,10(9):138-140.
- [15] AHMAD A,OLAH G,SZESNY B,et al.AP39, A mitochondrially targeted hydrogen sulfide donor, exerts protective effects in renal epithelial cells subjected to oxidative stress in vitro and in acute renal injury *in vivo* [J].Shock,2016,45(1):88-97.
- [16] HANCI V,EROL B,BEKTAS S,et al.Effect of dexmedetomidine on testicular torsion/detorsion damage in rats [J].Urol Int,2010,84(1):105-111.