

· 实验研究 ·

右美托咪定通过抑制 JAK/STAT 通路减轻
自体原位肝移植大鼠的肾损伤

王菲 贾莉莉 翁亦齐 张全胜 杜洪印 喻文立

【摘要】 目的 探讨 Janus 激酶/信号转导和转录激活子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)通路在右美托咪定减轻大鼠自体原位肝移植肾损伤的作用。**方法** SD 大鼠 50 只采用随机数字表法分为五组($n=10$):假手术组(S组),仅开腹并游离相应血管;模型组(M组),制备大鼠自体原位肝移植模型;右美托咪定组(D组),造模前 30 min 腹腔注射右美托咪定 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; JAK2 激酶抑制剂 AG490 组(A组),造模前 30 min 腹腔注射 AG490 (10 mg/kg);右美托咪定+阿替美唑组(T组),在注射右美托咪定 30 min 前腹腔注射阿替美唑 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$,之后操作同 D 组。S、M 和 D 组在与 A 和 T 组相应时点腹腔注射等量生理盐水。肝循环开放后 6 h(S 组术后 6 h),经肝下腔静脉采集血样后处死大鼠,取肾组织。检测血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、IL-6 和 TNF- α 浓度;观察肾组织病理学改变,行肾小管病理损伤评分;TUNEL 法检测肾脏细胞凋亡情况并计算凋亡指数(AI);Western blot 法检测磷酸化 JAK2(p-JAK2)、STAT1(p-STAT1)和 STAT3(p-STAT3)蛋白的表达水平。**结果** 与 S 组比较, M、D、A 和 T 组大鼠 IL-6、TNF- α 、Cr、BUN 浓度,肾小管损伤评分及 AI 明显升高, p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与 M 组比较, D 与 A 组 IL-6、TNF- α 、Cr、BUN 浓度、肾小管损伤评分及 AI 明显降低, p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与 D 组比较, T 组 IL-6、TNF- α 、Cr、BUN 浓度、AI 及肾小管损伤评分明显升高, 且 p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定减轻大鼠自体原位肝移植肾损伤的机制可能与抑制 JAK/STAT 通路激活从而减轻炎症反应和细胞凋亡有关。

【关键词】 右美托咪定; JAK/STAT 通路; 肝移植; 肾损伤

Dexmedetomidine attenuates kidney injury after autologous orthotopic liver transplantation via inhibiting the JAK/STAT signaling activation WANG Fei, JIA Lili, WENG Yiqi, ZHANG Quansheng, DU Hongyin, YU Wenli. The First Center Clinic College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China

Corresponding author: YU Wenli, Email: yzxyuwenli@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of Janus kinase and signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signaling pathway in dexmedetomidine's renoprotection after autologous orthotopic liver transplantation in rats. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into five groups ($n=10$ each) using a random number table; sham operation group (group S); autologous orthotopic liver transplantation model group (group M); dexmedetomidine group (group D); JAK2 kinase inhibitor AG490 group (group A); dexmedetomidine+atipamezole group (group T). In group D, rats received dexmedetomidine 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 30 min before establishing model; In group A, rats received AG490 10 mg/kg 30 min before establishing model; In group T, rats received atipamezole (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 30 min prior to dexmedetomidine treatment. Other groups were given the equal volume of normal saline in the same time points. At 6 h after reperfusion, rats were sacrificed, blood samples were harvested for detecting the serum concentration of creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). kidneys were removed for determination of the pathologic changes which were scored; Cell apoptosis was assessed by TUNEL, and apoptosis index(AI) was calculated. The expression of phosphorylations of JAK2, STAT1 and STAT3 were assessed by Western blot. **Results** Compared with group S, the levels of Cr, BUN, IL-6, TNF-

基金项目:天津市卫生行业重点攻关项目(13KG105);天津市卫生局科技基金(2011KY12);天津市应用基础研究计划面上项目(05YFJMJC14800)

作者单位:300192 天津医科大学一中心临床学院(王菲、贾莉莉);天津市第一中心医院麻醉科(喻文立、翁亦齐、杜洪印);天津市器官移植重点实验室(张全胜)

通信作者:喻文立, Email: yzxyuwenli@163.com

α , AI and renal tubular damage score were significantly increased, and the expression of p-JAK2, P-STAT1 and P-STAT3 was up-regulated in other groups ($P < 0.05$); Compared with group M, the levels of Cr, BUN, IL-6, TNF- α , AI and renal tubular damage score were significantly decreased, and the expression of p-JAK2, P-STAT1 and P-STAT3 was down-regulated in groups D and A ($P < 0.05$); Compared with group D, atipamezole have abolished dexmedetomidine's renoprotection, the levels of Cr, BUN, IL-6, TNF- α , AI and renal tubular damage score were significantly increased, and the expression of p-JAK2, P-STAT1 and P-STAT3 was up-regulated in group T ($P < 0.05$).

Conclusion Dexmedetomidine can attenuate kidney injury after autologous orthotopic liver transplantation, and the mechanism is associated with inhibiting the JAK/STAT pathway activation, alleviating inflammation reaction and cell apoptosis.

【Key words】 Dexmedetomidine; Liver transplantation; JAK/STAT pathway; Kidney injury

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是肝移植术后常见并发症之一,发生率可达 30%~50%^[1],严重影响肝移植患者的预后。其发生机制复杂,包括氧化应激、炎性反应和细胞凋亡等。右美托咪定是高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动药,除具有镇静、镇痛、阻滞交感神经等药理学特性外,大量研究表明其还具有抗氧化、抗炎等作用,可减轻器官缺血-再灌注损伤^[2~4]。Janus 激酶/信号转导和转录激活子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)通路是近年来研究较多的信号转导途径,广泛参与细胞增殖、分化、应激和凋亡等过程。研究表明,右美托咪定可通过抑制 JAK/STAT 信号通路激活减轻肾缺血再灌注损伤^[5, 6]。本实验通过建立大鼠自体原位肝移植模型,拟探讨 JAK/STAT 通路在右美托咪定减轻大鼠自体原位肝移植肾损伤中的作用。

材料与方法

实验动物及分组 SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠 50 只,鼠龄 8~10 周,体重 220~250 g,购于解放军军事医学科学院实验动物中心。按随机数字表法将大鼠分为五组($n=10$):假手术组(S 组)、模型组(M 组)、右美托咪定组(D 组)、JAK2 激酶抑制剂 AG490 组(A 组)、右美托咪定+阿替美唑组(T 组)。S 组大鼠仅开腹并游离相应血管;M 组参照文献[7]建立自体原位肝移植模型;D 组在造模前 30 min 腹腔注射右美托咪定 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$;A 组在造模前 30 min 腹腔注射 AG490 10 mg/kg ;T 组在给予右美托咪定前 30 min 腹腔注射阿替美唑 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$,之后操作同 D 组。S、M 和 D 组在与 A 和 T 组相应时点腹腔注射等量生理盐水。

手术方法 参照文献[7]并加以改良,术前禁食 12 h,自由饮水。腹腔注射 5%水合氯醛 60 mg/kg 麻醉,经腹正中切口入腹,分离肝周血管和韧

带并结扎右肾上腺静脉和食管静脉丛,然后使用无损伤血管夹依次夹闭肝固有动脉、门静脉和肝下下腔静脉,用肝素针经门静脉血管夹上方灌注 4℃肝素生理盐水 1 ml,之后夹闭肝上下腔静脉,阻断全部入肝血流。在肝下下腔静脉血管夹上方,使用显微剪在血管前壁开口 1~2 mm 作为流出道,经门静脉常压灌注 4℃复方乳酸钠 6~8 ml/min ,灌注时间为 40 min。可见肝脏逐渐变为土黄色,触之冰凉。灌注结束后,使用 8-0 无损伤缝合线缝合肝下下腔静脉流出道,依次开放肝上下腔静脉、肝下下腔静脉、门静脉、肝固有动脉,恢复肝脏血流,用温生理盐水冲洗腹腔后关腹。术中失血量超过 2 ml 者弃用。

血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、IL-6 和 TNF- α 浓度的测定 于肝循环开放后 6 h(S 组术后 6 h),经下腔静脉抽取血样 4 ml,离心后留取上清,应用全自动生化分析仪检测血清 Cr 及 BUN 的浓度。采用酶联免疫吸附法(ELISA),参照试剂盒(购于上海拜沃公司)测定血清 IL-6、TNF- α 浓度。

肾组织病理学观察 取左肾组织,10%中性甲醛固定后进行石蜡包埋,制备病理切片(厚约 4 μm),常规 HE 染色后于光镜下($\times 200$)观察肾组织病理学结果。由两位病理科医师双盲下采用 Jablonski 半定量评分评价肾小管损伤程度(0~4 分;0 分:正常;1 分:最轻度损伤, <5%的皮质或髓质外层损伤;2 分:轻度损伤, 5%~25%的皮质或髓质外层损伤;3 分:中度损伤, 26%~75%的皮质或髓质外层损伤;4 分:严重损伤 >75%的皮质或髓质外层损伤)^[8]。

肾组织细胞凋亡的检测 肾组织切片脱蜡水化后,采用 TUNEL 法检测细胞凋亡,具体操作按试剂盒(购于 Roche 公司,瑞士)说明书进行,后用 DAPI 复染。荧光显微镜下观察细胞凋亡情况,正常细胞核为蓝色,凋亡细胞核为红色;每张切片随机取 5 个高倍视野($\times 200$),计数凋亡细胞数和细胞

总数,计算凋亡指数(AI)=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

P-JAK2、P-STAT1、P-STAT3 蛋白表达水平的检测 采用 Western blot 法进行检测。取肾组织,称重、研磨,加蛋白裂解液(质量:体积=1:10)、蛋白酶抑制剂及磷酸化酶抑制剂,组织匀浆裂解 30 min 后,4℃ 13 000 r/min 离心 20 min,取上清,BCA 法蛋白定量。上样量为 70 μg ,于 10%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,随后转印至 PVDF 膜,室温下 5%脱脂牛奶封闭 2 h,随后加入兔抗 P-JAK2、P-STAT1、P-STAT3、GAPDH(均购于美国 Abcam 公司),4℃ 孵育过夜。TBST 清洗 3 次,每次 10 min;加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(购于北京中杉金桥公司),于室温下摇床孵育 1 h,TBST 清洗 3 次,每次 10 min;最后加入显色底物显色曝光,适当时间后进行显影和定影,采用 Image J 图像分析软件测定蛋白条带的灰度值,以 P-JAK2、P-STAT1、P-STAT3 分别与内参灰度值的比值反应目的蛋白的表达水平。

统计分析 采用 SPSS 13.0 进行统计学分析处理。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 法。

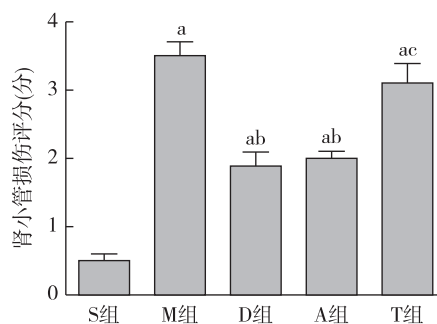
结 果

血清 Cr、BUN、IL-6 和 TNF- α 浓度 与 S 组比较,M、D、A 和 T 组 Cr、BUN、IL-6 和 TNF- α 浓度明显升高($P<0.05$);与 M 组比较,D 和 A 组 Cr、BUN、IL-6 和 TNF- α 浓度均明显降低($P<0.05$);与 D 组比较,T 组 Cr、BUN、IL-6 和 TNF- α 浓度明显升高($P<0.05$)(表 1)。

与 S 组比较,M、D、A 和 T 组肾小管损伤评分明显升高($P<0.05$);与 M 组比较,D 和 A 组肾小管损伤评分均降低($P<0.05$);与 D 组比较,T 组

肾小管损伤评分明显升高($P<0.05$)(图 1)。

大鼠肾脏病理学改变及损伤评分 光镜下观察 S 组无明显病理学改变;M 组和 T 组可见多数肾小管上皮细胞水肿,细胞空泡变性,肾小管扩张,管腔狭窄,间质扩张淤血及炎性细胞浸润等;D 组和 A 组损伤程度较 M 组减轻,肾小管上皮细胞水肿、空泡样变性减轻,间质淤血,炎性细胞浸润减轻(图 2)。



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$;与 D 组比较,^c $P<0.05$

图 1 五组大鼠肾组织肾小管损伤评分

AI 测定 与 S 组比较,M、D、A 和 T 组细胞凋亡严重,AI 明显升高($P<0.05$);与 M 组比较,D 和 A 组 AI 明显降低($P<0.05$);与 D 组比较,T 组 AI 明显升高($P<0.05$)(图 3)。

蛋白表达水平测定 与 S 组比较,M、D、A 和 T 组 p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显增加($P<0.05$);与 M 组比较,D 和 A 组 p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与 D 组比较,T 组 p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)(图 4)。

讨 论

肝移植过程中伴随着肝脏缺血-再灌注损伤不

表 1 五组大鼠血清 Cr、BUN、IL-6 和 TNF- α 水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Cr($\mu\text{mol/L}$)	BUN(mmol/L)	IL-6(pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
S 组	10	33 $\pm$ 3	7.8 $\pm$ 1.0	46.8 $\pm$ 7.1	30.8 $\pm$ 2.5
M 组	10	107 $\pm$ 12 ^a	16.4 $\pm$ 0.6 ^a	101.5 $\pm$ 5.5 ^a	97.5 $\pm$ 8.3 ^a
D 组	10	55 $\pm$ 6 ^{ab}	11.8 $\pm$ 1.4 ^{ab}	61.2 $\pm$ 2.9 ^{ab}	59.2 $\pm$ 3.6 ^{ab}
A 组	10	58 $\pm$ 7 ^{ab}	11.1 $\pm$ 1.4 ^{ab}	58.6 $\pm$ 4.0 ^{ab}	57.4 $\pm$ 4.4 ^{ab}
T 组	10	101 $\pm$ 10 ^{ac}	15.6 $\pm$ 1.1 ^{ac}	100.6 $\pm$ 4.5 ^{ac}	94.6 $\pm$ 8.6 ^{ac}

注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$;与 D 组比较,^c $P<0.05$

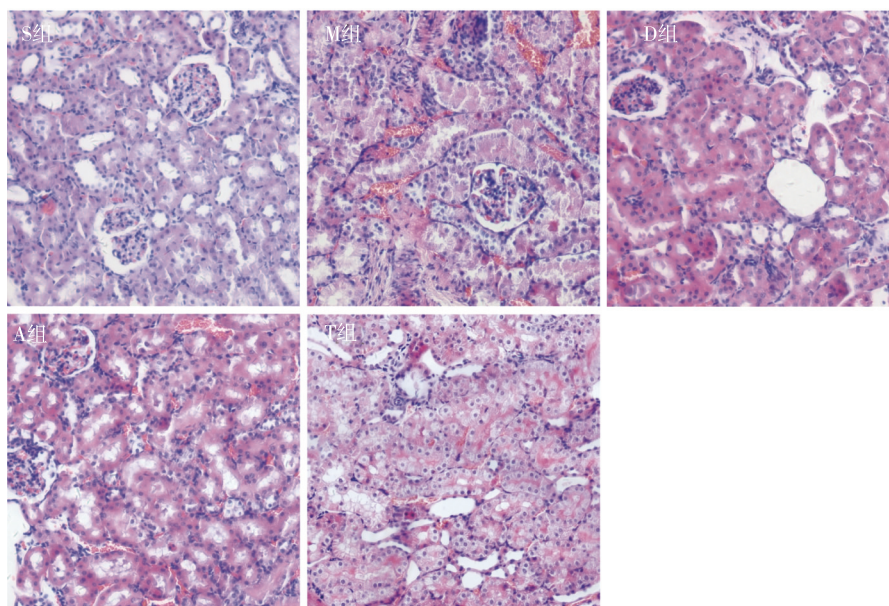
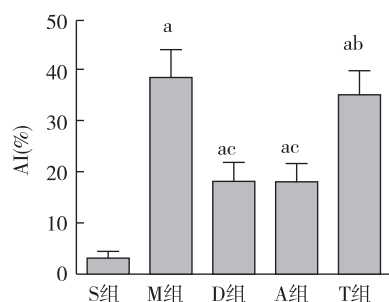
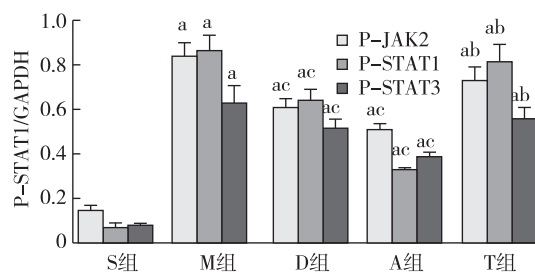


图 2 五组大鼠肾组织病理变化(HE 染色, ×200)



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 D 组比较,^b $P < 0.05$;与 M 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 五组大鼠肾脏细胞凋亡情况的比较



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 D 组比较,^b $P < 0.05$;与 M 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 五组大鼠 p-JAK2 和 p-STAT1、p-STAT3 蛋白表达水平的比较

仅损伤肝脏本身,还会导致心、脑、肾、肺等远隔脏器的损伤^[9]。与此同时,远隔脏器的病理生理改变又会引起机体其他脏器的损伤,进而引起恶性循

环。因此,研究肝缺血-再灌注后远隔脏器损伤机制及围术期保护措施至关重要。

已有研究发现右美托咪定可减轻脓毒症引起的急性肾损伤^[10],且同样有利于缓解肾缺血-再灌注损伤引起的急性肾损伤^[11]。此外,临床发现右美托咪定预处理可能有益于行心血管手术且术前肾功能低下的患者^[12]。然而,对于肝移植围术期右美托咪定的肾脏保护作用研究甚少,且潜在机制仍不明确。因此本研究建立大鼠自体原位肝移植模型,对静脉用药右美托咪定的肾保护作用进行研究。

参照文献^[13, 14]及预实验结果,本研究选择右美托咪定给药量为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$, AG490 给药量为 $10 \text{ mg}/\text{kg}$,并于肝循环开放后 6 h 检测各项指标。大量研究表明,右美托咪定预处理可通过抑制炎症因子释放,减少中性粒细胞浸润,减弱氧化应激反应等机制减轻缺血-再灌注介导的肾损伤^[4, 15]。IL-6 和 TNF- α 是参与缺血-再灌注损伤过程的重要细胞因子,可介导趋化因子的表达,促进中性粒细胞的激活、聚集与浸润,加重组织损伤^[16]。细胞凋亡为缺血性急性肾损伤后肾小管上皮细胞死亡的主要形式,并参与肾缺血-再灌注损伤过程^[17]。本研究结果表明,给予右美托咪定可改善肾功能,减轻病理损伤,减少肾小管内皮细胞凋亡及炎症因子的释放; α_2 -肾上腺素受体拮抗药阿替美唑可消除右美托咪定的肾脏保护作用,提示其减轻移植术后肾损伤是通过 α_2 -肾上腺素受体介导的。

JAK/STAT 信号通路是细胞因子信号转导的

重要途径之一,它可将细胞膜感受到的信号直接传递至核内,激活靶基因的转录,环节少而简洁。研究表明,JAK/STAT 信号通路参与缺血-再灌注损伤过程,然而此通路及其抑制剂 AG490 在缺血-再灌注损伤过程中的作用仍存在争议。Buendia 等^[18]研究发现褪黑素受体激动剂 Neu-P11 能够激活 JAK/STAT 通路减轻脑缺血-再灌注模型中氧化应激反应。Si 等^[19]发现抑制 JAK2/STAT3 通路减轻了肾缺血-再灌注肾小管细胞凋亡。本研究显示缺血-再灌注损伤后 p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达显著增强,给予 JAK2 特异性抑制剂 AG490 后,p-JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达下调。与此同时,AG490 组大鼠肾功能得到改善,肾脏病理损伤减轻,炎症反应及细胞凋亡均明显减弱。提示本研究模型中,抑制 JAK/STAT 信号通路激活可减轻肾脏损伤。给予右美托咪定后,p-JAK2 和 p-STAT1、p-STAT3 的表达水平明显降低,提示右美托咪定可抑制 JAK/STAT 通路激活。因此,右美托咪定减轻自体原位肝移植后肾损伤与抑制该通路激活有关。

综上所述,右美托咪定可通过抑制 JAK/STAT 通路激活,减轻自体原位肝移植术所致的肾损伤,干预此通路可能成为肝移植围术期远隔脏器保护的新措施。

参 考 文 献

- [1] Nadim MK, Genyk YS, Tokin C, et al. Impact of the etiology of acute kidney injury on outcomes following liver transplantation: acute tubular necrosis versus hepatorenal syndrome. *Liver Transpl*, 2012, 18(5):539-548.
- [2] Bell MT, Puskas F, Bennett DT, et al. Dexmedetomidine, an α -2a adrenergic agonist, promotes ischemic tolerance in a murine model of spinal cord ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 147(1):500-506.
- [3] Shen J, Fu G, Jiang L, et al. Effect of dexmedetomidine pretreatment on lung injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Exp Ther Med*, 2013, 6(6):1359-1364.
- [4] Yu X, Chi X, Wu S, et al. Dexmedetomidine pretreatment attenuates kidney injury and oxidative stress during Orthotopic autologous liver transplantation in rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:4675817.
- [5] Si Y, Bao H, Han L, et al. Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the JAK/STAT signaling activation. *J Transl Med*, 2013, 11:141.
- [6] 斯妍娜, 鲍红光, 张勇, 等. 右美托咪定对大鼠肾缺血-再灌注损伤的保护作用. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(3): 261-264.
- [7] Nozato E, Shiraishi M, Miyaguni T, et al. In situ perfusion of the liver under portosystemic shunt in rats: a stable model of cold ischemia for orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*, 1998, 30(7):3718-3720.
- [8] Jablonski P, Howden BO, Rae DA, et al. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*, 1983, 35(3):198-204.
- [9] Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, et al. Global Consequences of Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:906965.
- [10] Hsing CH, Lin CF, So E, et al. 2-Adrenoceptor agonist dexmedetomidine protects septic acute kidney injury through increasing BMP-7 and inhibiting HDAC2 and HDAC5. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(10):F1443-F1453.
- [11] Cakir M, Polat A, Tekin S, et al. The effect of dexmedetomidine against oxidative and tubular damage induced by renal ischemia reperfusion in rats. *Ren Fail*, 2015, 37(4):704-708.
- [12] Morgan CJ, Gill PJ, Lam S, et al. Peri-operative interventions, but not inflammatory mediators, increase risk of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective cohort study. *Intensive Care Med*, 2013, 39(5):934-941.
- [13] Wang H, Chen H, Wang L, et al. Acute hyperglycemia prevents dexmedetomidine-induced preconditioning against renal ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*, 2014, 29(12):812-818.
- [14] Koca U, Olguner CG, Ergür BU, et al. The effects of dexmedetomidine on secondary acute lung and kidney injuries in the rat model of intra-abdominal sepsis. *Scientific World Journal*, 2013, 2013:292687.
- [15] Lempiäinen J, Finckenberg P, Mervaala EE, et al. Dexmedetomidine preconditioning ameliorates kidney ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res Perspect*, 2014, 2(3):e00045.
- [16] Sun P, Liu J, Li W, et al. Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice. *J Transl Med*, 2016, 14:28.
- [17] Arai S, Kitada K, Yamazaki T, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nat Med*, 2016, 22(2):183-193.
- [18] Buendía I, Gómez-Rangel V, González-Lafuente L, et al. Neuroprotective mechanism of the novel melatonin derivative Neu-P11 in brain ischemia related models. *Neuropharmacology*, 2015, 99:187-195.
- [19] Si YN, Bao HG, Xu L, et al. Dexmedetomidine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(13):1843-1851.

(收稿日期:2016-02-21)