

· 实验研究 ·

羟考酮预给药对大鼠肾缺血-再灌注损伤的影响

孔岚 卢锡华

【摘要】目的 评价羟考酮预给药对大鼠肾缺血-再灌注损伤的影响。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠 30 只, 采用随机数字表法, 将其分为三组 ($n=10$), 假手术组 (S 组): 仅切除右肾、分离左侧肾动脉、肾静脉和输尿管; 缺血-再灌注组 (IR 组): 切除右侧肾脏, 夹闭左侧肾动脉和肾静脉 45 min 恢复灌注 2 h; 羟考酮预给药+缺血-再灌注组 (O 组): 缺血-再灌注前 5 min 静脉注射羟考酮 2 mg/kg。于再灌注 2 h 时经腹主动脉采集动脉血样, 血清尿素氮 (BUN) 浓度采用脲酶法测定, 血清肌酐 (Cr) 浓度采用速率法测定。处死大鼠, 取部分左肾组织, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定, 丙二醛 (MDA) 含量采用硫代巴比妥酸法测定。采用 Western blot 检测肾组织中 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。**结果** 与 S 组比较, IR 组和 O 组血清 BUN 和 Cr 的浓度明显升高 ($P<0.05$), 肾组织 MDA 的含量明显升高, SOD 活性明显降低 ($P<0.05$), 肾组织 bax、Caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$), 而 bcl-2 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$)。与 IR 组比较, O 组血清 BUN 和 Cr 的浓度明显降低 ($P<0.05$), 肾组织 MDA 的含量明显降低, SOD 活性明显升高 ($P<0.05$) 肾组织 bax、Caspase-3 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$), 而 bcl-2 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)。**结论** 羟考酮预给药可减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤, 其机制可能与其抑制肾组织氧化应激反应和细胞凋亡有关。

【关键词】 羟考酮; 预给药; 缺血-再灌注损伤

Effect of oxycodone pretreatment on renal ischemia-reperfusion injury in rats KONG Lan, LU Xihua.
Department of Anesthesiology, The Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China

Corresponding author: LU Xihua, Email: lxh-hnszlyy@163.com

【Abstract】Objective To evaluate the effects of oxycodone pretreatment on renal ischemia-reperfusion (IR) injury in rats. **Methods** Thirty adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n=10$ each) using a random number table: sham operation group (group S), group IR, and oxycodone pretreatment + IR group (group O). After removing the right kidney in rats, the renal I/R was built by occlusion of the left renal artery and vein for 45 min with a traumatic microclips followed by 2 h reperfusion in I/R and O group. In group S, the right kidney was performed and the left renal artery, vein and ureter were isolated without occluding blood flow. In group O, oxycodone 2 mg/kg were infused intravenously 5 min before onset of ischemia. At 2 h of reperfusion, blood samples were taken from the abdominal aorta to determine the concentrations of serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr). After blood sampling, the rats were sacrificed, and the left kidney were removed for determination of malondialdehyde (MDA) content (by thiobarbituric acid method) and superoxide dismutase (SOD) activity (using xanthine oxidase method). The expression levels of B-cell lymphoma-2 (bcl-2), bcl-2 Associated X protein (bax) and cyteiny l aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) protein were detected by Western blotting, respectively. **Results** Compared with group S, the serum BUN and Cr concentrations, and the contents of MDA, bax and Caspase-3 in renal tissues were significantly increased, the content of bcl-2 and SOD activity in renal tissues were significantly decreased in the other two groups ($P<0.05$). Compared with group IR, the serum BUN and Cr concentrations, and the contents of MDA, bax and Caspase-3 in renal tissues were significantly decreased, the content of bcl-2 and SOD activity in renal tissues were significantly increased in group O ($P<0.05$). **Conclusion** Oxycodone can alleviate renal I/R injury in rats, and the mecha-

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究项目 (152300410163)

作者单位: 450008 郑州大学附属肿瘤医院麻醉科

通信作者: 卢锡华, Email: lxh-hnszlyy@163.com

nism is related to inhibition of oxidative stress response and cell apoptosis.

【Key words】 Oxycodone; Pretreatment; Ischemia reperfusion injury

肾缺血-再灌注损伤是临床上造成急性肾功能衰竭的常见原因,多见于失血性休克复苏、心跳骤停复苏等。也是临床麻醉中经常遇到的问题,因此选择适合的麻醉药物以减轻肾缺血-再灌注损伤就尤为重要。羟考酮作为一种新型的镇痛药,目前是临床上唯一的阿片 κ 受体和 μ 受体双受体激动剂,在临床麻醉中应用的越来越多。叶元梅等^[1]研究表明羟考酮预先给药可减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤,那么羟考酮预先给药是否可以减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤,本文加以探讨,以便为临床工作提供参考。

材料与方 法

动物选择与分组 本研究已经医院动物伦理委员会批准。成年雄性健康 SD 大鼠 30 只,购自郑州大学动物实验中心(合格证号 20160312),体重 220~300 g,置于恒温、清洁的环境中饲养,随机分为假手术组(S 组),缺血-再灌注组(IR 组),羟考酮预先给药+缺血-再灌注组(O 组),每组 10 只。

使用药物及器材 盐酸羟考酮注射液(批号:AW123);规格:1 ml,10 mg;肝素钠(批号:H32025851);规格 2 ml,12 500 U;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒;bax、Caspase-3、bcl-2 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗、二抗工作液,HX-100E 小动物呼吸机;电泳仪。

建立大鼠模型和实施药物干预 大鼠肾缺血-再灌注损伤模型按照文献^[2]介绍的方法制备。注射 2%戊巴比妥钠 50 mg/kg 于大鼠腹腔实施麻醉后,将大鼠仰卧位固定在有保温设施的实验台上,行气管切开术,然后连接小动物呼吸机行机械通气,潮气量 15~20 ml/kg,通气频率 60 次/分,吸呼比 1:2,股静脉穿刺置入 24G 静脉留置针用于输液和给药。取腹部正中切口,分别显露右肾及肾蒂、左肾及肾蒂。结扎右侧肾蒂切除右侧肾脏;用血管夹夹闭左侧肾蒂 45 min,可见左肾从红色变为暗红色,表明缺血成功,缺血 45 min 后移除血管夹恢复血供,可见肾脏从暗紫色转成红色表明再灌注成功^[3]。S 组仅切除右肾,分离左侧肾动脉、肾静脉和输尿管,O 组于缺血前 5 min 经股静脉注射羟考酮 2 mg/kg,S 组和 IR 组注射等量生理盐水。模型制

备过程中采用 BWZ-50C6 微量注射泵静脉输注复方乳酸钠 6 ml·kg⁻¹·h⁻¹。

血清尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)浓度的测定 于再灌注 2 h 时采集腹主动脉血样 2 ml,采用 AU5400 全自动生化分析仪测定 BUN 和 Cr 浓度,BUN 浓度采用脲酶法测定,Cr 浓度采用速率法测定。

肾组织丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 采集血样 10 min 后采用断头方式处死大鼠,取左肾组织用来制备 10%组织匀浆,低温离心,后取上层悬液,用 AU2700 全自动生化分析仪测定 MDA、SOD,MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定,SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定。

bax、Caspase-3、bcl-2 蛋白表达的测定 取部分肾组织反复研磨,使之成为组织匀浆,用低温高速离心,后取上清液,蛋白浓度用 Bradford 法测定。先将蛋白煮沸变性,后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜(聚丙烯酰胺凝胶电泳),5%脱脂奶粉封闭,37℃ 下反应后,加入 bax、Caspase-3、bcl-2 一抗及 GAPDH 一抗,于 4℃ 下过夜,后加入二抗,于室温下反应 1.5 h,进行化学发光以及显影和定影。半定量分析使用 Quantity One 图像分析软件。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件分析数据。正态分布计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

血清中 BUN 和 Cr 浓度 IR 组和 O 组血清 BUN 和 Cr 浓度明显高于 S 组($P < 0.05$),O 组血清中 BUN 和 Cr 浓度明显低于 IR 组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 三组大鼠血清中 BUN 和 Cr 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	BUN(mmol/L)	Cr(μ mmol/L)
S 组	10	5.1±0.6	22.3±5.1
IR 组	10	17.9±2.1 ^a	96.2±15.3 ^a
O 组	10	13.8±3.2 ^{ab}	75.1±10.2 ^{ab}

注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

肾组织中 MDA 含量和 SOD 活性 IR 组和 O 组肾组织中 MDA 的含量明显高于 S 组 ($P < 0.05$), SOD 活性明显低于 S 组 ($P < 0.05$), O 组肾组织中 MDA 的含量明显低于 IR 组 ($P < 0.05$), SOD 活性明显高于 IR 组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 三组大鼠肾组织中 MDA 含量和 SOD 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
S 组	10	0.39 ± 0.02	115.12 ± 7.23
IR 组	10	0.78 ± 0.04 ^a	58.13 ± 6.24 ^a
O 组	10	0.59 ± 0.06 ^{ab}	79.30 ± 5.03 ^{ab}

注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$;与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

肾组织 bax、Caspase-3、bcl-2 蛋白表达 IR 组和 O 组肾组织 bax、Caspase-3 蛋白表达明显高于 S 组 ($P < 0.05$), bcl-2 蛋白表达明显低于 S 组 ($P < 0.05$)。O 组肾组织 bax、Caspase-3 蛋白表达明显低于 IR 组 ($P < 0.05$), bcl-2 蛋白表达明显高于 IR 组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 三组大鼠肾组织 bax、Caspase-3、bcl-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	bax	Caspase-3	bcl-2
S 组	10	99.98 ± 12.25	99.98 ± 13.02	99.98 ± 11.12
IR 组	10	235.63 ± 27.46 ^a	195.76 ± 21.15 ^a	37.71 ± 5.01 ^a
O 组	10	174.55 ± 17.02 ^{ab}	146.51 ± 15.72 ^{ab}	68.91 ± 7.93 ^b

注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$;与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

讨 论

肾缺血-再灌注损伤(AKI)在心肺复苏、失血性休克、肾脏移植、累及肾动脉的腹主动脉瘤切除术等过程均可以发生^[4]。肾再灌注后的缺血性损伤是肾缺血-再灌注损伤的主要临床表现^[5,6]。预防和减轻肾缺血-再灌注所引起的肾缺血-再灌注损伤一直是临床重点研究的课题。羟考酮是阿片类生物碱的半合成蒂巴因衍生物,是阿片 κ 受体和 μ 受体双受体激动剂,静脉注射药效达峰时间为 3~5 min,因而本研究选择缺血前 5 min 给予羟考酮静脉注射。Sithisarn 等^[7]研究表明,大鼠妊娠后 8~21 d 内每天静脉注射羟考酮 2 mg/kg,对子代大鼠无明显的认知功能损害,因此本实验选择羟考酮 2 mg/kg 作为注射剂量。

在本实验模型中,切除右侧肾脏后再夹闭左侧肾蒂,即在左侧肾脏缺血前切除了右肾,从而避免了右肾对损伤左肾功能的代偿,更准确地反映了肾缺血-再灌注损伤。在本研究中三组大鼠的肾脏均是在正常范围内使用的肾脏,本研究是通过建立肾缺血-再灌注损伤模型来研究药物的相关作用。正常生理状态下体内 BUN 和 Cr 主要从肾小球滤出,当肾小球功能受损时,其因滞留导致血液浓度升高。本研究中三组大鼠血清 BUN 和 Cr 浓度比较的结果显示,羟考酮能够减轻大鼠肾功能的损伤。

组织器官缺血-再灌注时,体内氧自由基生成增多,氧自由基与膜磷脂中的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,产生大量有毒的脂质过氧化产物,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]。本研究中三组大鼠肾组织 MDA 含量及 SOD 活性相比较的结果,提示羟考酮可减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤,机制可能与其抑制氧化应激反应有关。

细胞凋亡在肾缺血-再灌注损伤中具有重要作用^[14]。Hatcher 等^[15]研究结果表明在缺血-再灌注损伤中,细胞凋亡是再灌注后炎症反应和组织损伤的一个重要因素。bcl-2 和 bax 是调节细胞凋亡的重要途径,bcl-2 具有减少细胞色素 C 释放、抑制细胞凋亡的效应,而 bax 则能够拮抗 bcl-2 所介导的抑制凋亡作用。缺血-再灌注会影响细胞中 bcl-2 和 bax 的平衡,导致细胞色素 C 大量释放进入胞质,进而引起细胞 Caspase 凋亡途径被激活、细胞发生凋亡、组织功能发生损伤^[16]。本研究中三组大鼠肾组织中 bax、Caspase-3 及 bcl-2 的表达量比较的结果显示,羟考酮可以抑制细胞凋亡。

国内外研究阿片类药物如吗啡和瑞芬太尼通过激动阿片受体,可以减轻肾或心肌缺血-再灌注损伤^[17,18]。羟考酮为阿片 μ 受体和 κ 受体激动剂,其抑制肾组织氧化应激反应和肾组织细胞凋亡的机制可能与其激动阿片受体有关。

羟考酮预给药减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤的机制也可能与其上调 bcl-2 表达从而抑制细胞自噬有关。自噬,又称 II 型程序性细胞死亡,可有效

清除细胞中的生物大分子及损伤或衰老的细胞器,细胞自噬过度或不足都可能导致细胞死亡。缺血-再灌注、中毒等都可诱导自噬的发生,从而导致肾功能受损^[19]。有实验观察到人肾小管细胞系和大鼠缺血-再灌注模型中自噬增强;提高 bcl-2 表达可以抑制细胞自噬及凋亡,减轻肾缺血-再灌注损伤^[20]。

综上所述,羟考酮预给药可减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤,其机制可能与其抑制肾组织氧化应激反应和肾组织细胞凋亡及自噬有关。本研究亦可提示我们在临床工作中可通过羟考酮预给药来减轻患者肾缺血-再灌注损伤。

参 考 文 献

- [1] 叶元梅,冷玉芳,杨佩宁,等.羟考酮预先给药对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其与 P13K/Akt 信号通路的关系.中华麻醉学杂志,2016,36(8):946-949.
- [2] Basile DP, Donohoe D, Cao X, et al. Resistance to ischemic acute renal failure in the Brown Norway rat: a new model to study cytoprotection. *Kidney Int*, 2004, 65(6): 2201-2211.
- [3] 陈刘芳,靖国庆,杨建国,等.不同剂量羟考酮对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响.中华麻醉学杂志,2015,35(10):1277-1280.
- [4] 周大春,马晓旭,谢俊然,等.羟乙基淀粉(130/0.4)对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护.中华医学杂志,2007,87(45):3224-3227.
- [5] Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10(1): 147-155.
- [6] 姜俊,滕杰,丁小强.急性肾损伤患者远期预后的研究进展.中华医学杂志,2014,94(8):635-637.
- [7] Sithisarn T, Bada HS, Charnigo RJ, et al. Effects of pefinatal oxycodone exposure on the cardiovascular response to acute stress in male rats at weaning and in young adulthood. *Front Physiol*, 2013, 4: 85.
- [8] HE F, Xu BL, Chen C, et al. Methylophipogonanone A suppresses ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis in mice via activating P13K/Akt/eNOS signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(6): 763-771.
- [9] Fang J, Hu F, Ke D, et al. N, N-dimethylsphingosine attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by recruiting regulatory T cells through P13K/Akt pathway in mice. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111(3): 32.
- [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.中华麻醉学杂志,2016,36(2):219-222.
- [11] Stoops WW, Hatton KW, Lofwall MR, et al. Intravenous oxycodone, hydrocodone, and morphine in recreational opioid users: abuse potential and relative potencies. *Psychopharmacology (Berl)*, 2010, 212(2): 193-203.
- [12] 王英,谢平,张琳,等. PI3K/Akt/GSK-3 β 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.中华麻醉学杂志,2014,34(10):1237-1240.
- [13] 刘春伟,丛洪良,于雪芳,等. PI3K-Akt/mito-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.天津医药,2015,43(1):46-50.
- [14] Ahmad A, Olah G, Szezesny 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. *Shock*, 2016, 45(1): 88-97.
- [15] Hatcher HC, Tesfay L, Torti SV, et al. Cytoprotective effect of ferritin H in renal ischemia reperfusion injury. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138505.
- [16] Hanci V, Erol B, Bektas S, et al. Effect of dexmedetomidine on testicular torsion/detorsion damage in rats. *Urol Int*, 2010, 84(1): 105-111.
- [17] Groban L, Vernon JC, Butterworth J. Intrathecal morphine reduces infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Anesth Analg*, 2014, 98(4): 903-909.
- [18] 熊颖芬,金小雪,孟叶,等.阿片受体在瑞芬太尼减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤中的作用.中华麻醉学杂志,2012,32(7):877-879.
- [19] Huber TB, Edelstein CL, Hartleben B, et al. Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging. *Autophagy*, 2012, 8(7): 1009-1031.
- [20] 刘振臻,冷玉芳,李轩杰,等.羟考酮预先给药对大鼠肾缺血再灌注时自噬的影响.中华麻醉学杂志,2017,37(3):379-381.

(收稿日期:2017-03-15)