

· 实验研究 ·

右美托咪定对大鼠离体肺缺血-再灌注损伤时
ERK 1/2 和 Akt 激活的影响

李梦倩 李彬 董铁立

【摘要】 目的 评价右美托咪定对大鼠离体肺缺血-再灌注损伤(lung ischemia-reperfusion injury, LIRI)时胞外信号调节激酶(ERK 1/2)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)激活的影响。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 45 只,随机分为三组:对照组(C 组)、缺血-再灌注组(IR 组)和右美托咪定组(DEX 组),每组 15 只。C 组大鼠离体肺在 IL-2 离体肺灌流系统内维持正常的生理活动,只通气和灌流 150 min;IR 组和 DEX 组大鼠离体肺在 IL-2 离体肺灌流系统中维持 15 min 后,停止通气和灌流 60 min 后再通气和复灌 75 min;DEX 组复灌开始时于离体灌流液中加入右美托咪定 10 nmol/L。C 组和 IR 组分别于灌流 75 min 和复灌开始时在离体灌流液中加入等体积生理盐水。检测肺泡损伤率(IAR)。采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定肺组织 ERK 1/2、Akt mRNA 表达量,Western blot 法测定磷酸化-ERK (p-ERK 1/2)、磷酸化-Akt (p-Akt)蛋白含量。**结果** 与 C 组比较,IR 组和 DEX 组 IAR、肺组织 ERK 1/2、Akt mRNA 表达量和 p-ERK 1/2 及 p-Akt 蛋白含量均明显升高($P < 0.05$);与 IR 组比较,DEX 组 IAR、肺组织 ERK 1/2、Akt mRNA 表达量和 p-ERK 1/2 及 p-Akt 蛋白含量均明显降低($P < 0.05$)。**结论** 右美托咪定可减轻大鼠离体 LIRI,其机制可能与其抑制 ERK 1/2 和 Akt 的激活有关。

【关键词】 右美托咪定;胞外信号调节激酶;丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶;缺血-再灌注损伤

Effect of dexmedetomidine on activations of pulmonary ERK 1/2 and Akt during isolated lung ischemia-reperfusion injury in rats LI Mengqian, LI Bin, DONG Tieli. Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

Corresponding author: DONG Tieli, Email: tlddtl@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of dexmedetomidine on activations of pulmonary extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) and serine-threonine kinase (Akt) during isolated lung ischemia-reperfusion injury (LIRI) in rats. **Methods** Forty-five adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n=15$ each): control group (group C), ischemia-reperfusion group (group IR) and dexmedetomidine group (group DEX). Isolated rat lungs were maintained for normal physical activity, and only received ventilation and perfusion for 150 min in the IL-2 ex-vivo lung perfusion system in group C. Isolated rat lungs were subjected to 60 min of ischemia and apnea followed by 75 min reperfusion and ventilation 15 min after perfusion in the IL-2 ex-vivo lung perfusion system in groups IR and DEX. Dexmedetomidine with a dose of 10 nmol/L was administered into perfusion fluid at the onset of reperfusion in group DEX, and the same volume of saline was injected when perfusion for 75 min and at the onset of reperfusion in groups C and IR, respectively. Pathological changes of lungs were examined and the injured alveolus rate (IAR) was counted under light microscope. The expression levels of ERK 1/2 or Akt mRNA and phosphorylate-ERK 1/2 (p-ERK 1/2) or phosphorylate-Akt (p-Akt) protein of lung tissue were tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. **Results** Compared with group C, the IAR and the expression levels of ERK 1/2 and Akt mRNA or p-ERK 1/2 and p-Akt protein in lung tissue were higher in groups IR and DEX ($P < 0.05$). Compared with group IR, the IAR and the expression levels of ERK 1/2 and Akt mRNA or p-ERK 1/2 and p-Akt protein in lung tissue were lower in group DEX ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine may reduce LIRI in rat isolated lungs via inhibiting the expressions of IL-6 and IL-8, and the mechanism may be related to suppressing activations of ERK 1/2 and Akt.

【Key words】 Dexmedetomidine; Extracellular signal-regulated kinase; Serine-threonine kinase; Ischemia-reperfusion injury

DOI:10.12089/jca.2018.04.015

作者单位:450014 郑州大学第二附属医院麻醉科

通信作者:董铁立,Email:tlddtl@163.com

肺缺血-再灌注损伤(lung ischemia-reperfusion injury, LIRI)多见于肺移植或心肺联合移植、心肺转流、肺切除、肺栓塞、复张性肺水肿、休克以及心肺复苏等。LIRI 是影响器官移植长期存活率的重要因素之一^[1],如何减轻 LIRI 一直是国内外研究的重点领域。在 LIRI 的众多可能机制中,胞外信号调节激酶(ERK 1/2)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)激活得到了部分证实^[2]。右美托咪定是高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动药,对多种器官如肺脏等的缺血-再灌注损伤有保护作用。在肺缺血-再灌注模型中,右美托咪定预处理对炎症反应具有抑制作用^[3],但其作用机制尚需进一步研究。本研究通过建立大鼠离体 LIRI 模型,探讨右美托咪定对离体 LIRI 大鼠肺组织 ERK 1/2 和 Akt 激活的影响。

材料与方法

实验仪器与试剂 IL-2 离体肺灌流系统,101-1A 电热恒温鼓风干燥箱,HT7700 型电子透射电镜,mini-p4 型电泳仪、电转仪。Krebs-Henseleit (K-H)液各组份,大鼠白细胞介素-6 (IL-6)和白细胞介素-8(IL-8)ELISA 试剂盒,二辛可酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒,逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒,ERK、磷酸化-ERK 1/2 (p-ERK 1/2)、Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)及 β -actin 一抗,二抗工作液,余均为市售分析纯。

实验动物与分组 成年健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只,3 月龄,体重 250~320 g,由上海斯莱克有限公司提供,饲养温度 22~25℃,相对湿度 55%~60%,自由饮水摄食。采用随机数字表法将大鼠随机分为三组:对照组(C 组)、缺血-再灌注组(IR 组)和右美托咪定组(DEX 组),每组 15 只。

模型制备 参照文献[4,5]介绍的方法并进行改良后制备大鼠离体 LIRI 模型。腹腔注射 3%戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg,颈部正中切口,气管内插管,连接小动物呼吸机,机械通气。前正中切口开胸后,分离肺动脉干,暂不结扎,向左心室注射肝素钠 1 000 U/kg,右心室横向切口,经右心室向肺动脉干插入导管,结扎固定,左心室靠近心尖位置,纵向切口,导管经左心室开口,插入至左心房,用 1 号丝线,在左心室开口处,连同导管一起结扎,形成闭合回路,向肺动脉灌注灌流液。迅速游离肺组织,置入 IL-2 离体肺灌流系统的负压室,切换通气模式,以负压通气。IL-2 离体肺灌流系统内灌流液温度为 37℃,pH 7.35~7.45,并以 10 cm H₂O 的恒压

进行灌流,输入气体为空气。C 组大鼠离体肺在 IL-2 离体肺灌流系统内维持正常的生理活动,只通气和灌流 150 min;IR 组和 DEX 组大鼠离体肺在 IL-2 离体肺灌流系统中维持 15 min 后,停止通气和灌流 60 min 后再通气和复灌 75 min。DEX 组复灌开始时于离体灌流液中加入右美托咪定 10 nmol/L^[7],C 组和 IR 组分别于灌流 75 min 和复灌开始时在离体灌流液中加入等体积生理盐水。实验结束后留取肺组织以备用。

离体肺功能的监测 在 IL-2 离体肺灌流系统中记录初灌 10 min、复灌后 15、45 和 75 min 时的肺顺应性、气道压力、灌注流量和 PaO₂。

肺组织湿/干重比(W/D)的测定 取大鼠左肺上叶组织,生理盐水冲洗片刻后用滤纸吸去多余水分后称重,即为湿重(W);60℃下经 48 h 烘干后称重,即为干重(D)。

肺组织形态学观察及肺泡损伤率(IAR)的检测 10%甲醛溶液将左肺下叶固定。常规行石蜡包埋,切片,HE 染色,光学显微镜下进行观察。参照文献[6]的方法测定 IAR。

肺组织超微结构的观察 取 2.5%戊二醛溶液固定的左肺上叶组织约 1 mm×1 mm×1 mm,再行 1%锇酸后固定,1%醋酸铀块染,乙醇梯度脱水,丙酮浸透,包埋聚合,半薄和超薄切片,醋酸铀和硝酸铅双重染色,透射电镜下观察。

ELISA 法测定灌流液中 IL-6 和 IL-8 浓度 提取灌流液 5 ml,于 4℃下 3 000 r/min 离心 20 min。留取上清液,-80℃下保存。按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6 和 IL-8 浓度。

逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法测定肺组织 ERK 1/2、Akt mRNA 表达量 称取 100 mg 大鼠右肺下叶组织,采用 Trizol 法抽提肺组织总 RNA 并测定其浓度。按照说明书逆转录合成并扩增 cDNA。将 PCR 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,拍照,用 Quantity One 图像分析软件进行半定量分析。ERK 1/2 引物序列:正义链 5'-GGTAGACG-GTTCTGGAATGGAAGG-3',反义链 5'-GT-CAGGGAAAATGGGGTGGG-3',扩增片段长度 228 bp。Akt 引物序列:正义链 5'-AATACCTG-GTGTCGGTCTCA-3',反义链 5'-TCGAGCT-CATCCTAATGGAG-3',扩增片段长度 121 bp。 β -actin 引物序列:正义链 5'-GAAGTACCCATT-GAACACG-3',反义链 5'-CAGGTCCAGACG-CAGGATGG-3',扩增片段长度 432 bp。

Western blot 法测定肺组织 p-ERK 1/2、p-Akt 蛋白含量 称取 100 mg 大鼠右肺上叶组织加入 400 μ l 单去污剂裂解液裂,冰块上反复研磨,组织匀浆,于 4℃ 下 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 法测定蛋白含量。采用 Quantity One 图像分析软件进行半定量分析。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内不同时间点比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肺功能 与初灌 10 min 比较,复灌后 15、45 和 75 min 三组气道压力明显增高,肺顺应性、灌注流量和 PaO_2 明显下降($P < 0.05$)。与 C 组比较,复灌后 15、45 和 75 min IR 组和 DEX 组气道压力明显增高,肺顺应性、灌注流量和 PaO_2 明显降低($P < 0.05$)。与 IR 组比较,复灌后 15、45 和 75 min DEX 组气道压力明显降低($P < 0.05$),肺顺应性、灌注流量和 PaO_2 明显增高($P < 0.05$)(表 1)。

肺组织形态学 光镜下,C 组肺组织结构清晰,未见明显损伤;IR 组肺组织结构明显破坏,肺间质水肿,伴炎性细胞浸润,肺泡壁有破裂,其内可见红细胞漏出及水肿液渗出;DEX 组肺组织较 IR 组损伤明显减轻,肺泡结构相对完整,肺间质水肿减轻,

炎性细胞浸润减少,肺泡内水肿液渗出及红细胞漏出均减少(图 1)。

肺组织超微结构 C 组肺组织超微结构无明显损伤改变;IR 组肺泡 II 型上皮细胞肿胀明显,表面微绒毛明显减少甚至消失,线粒体肿胀,板层小体出现空泡或减少甚或消失,胞核碎裂较多,染色质分布不均;DEX 组肺泡 II 型上皮细胞轮廓较清晰,细胞肿胀减轻,表面微绒毛明显增多,线粒体趋向正常,板层小体增多,胞核边界较完整,染色质相对均匀(图 2)。

肺组织 W/D、IAR 及灌流液中 IL-6、IL-8 浓度与 C 组比较,IR 组和 DEX 组肺组织 W/D、IAR 及灌流液中 IL-6、IL-8 浓度明显升高($P < 0.05$);与 IR 组比较,DEX 组肺组织 W/D、IAR 及灌流液中 IL-6、IL-8 浓度明显降低($P < 0.05$)(表 2)。

肺组织 ERK 1/2 和 Akt mRNA 表达量及 p-ERK 1/2 和 p-Akt 蛋白含量 与 C 组比较,IR 组肺组织 ERK 1/2 和 Akt mRNA 表达量、p-ERK 1/2 和 p-Akt 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。与 IR 组比较,DEX 组肺组织 ERK 1/2 和 Akt mRNA 表达量、p-ERK 1/2 和 p-Akt 蛋白含量明显降低($P < 0.05$)(图 3~6)。

讨 论

研究采用 IL-2 型大鼠离体肺灌流系统复制大鼠离体肺缺血-再灌注模型,分别选取 45、60、75 min

表 1 三组大鼠不同时间点肺功能的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	初灌 10 min	复灌后 15 min	复灌后 45 min	复灌后 75 min
气道压力 ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	C 组	15	0.27 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03 ^a	0.33 $\pm$ 0.04 ^a	0.34 $\pm$ 0.05 ^a
	IR 组	15	0.26 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.45 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.57 $\pm$ 0.08 ^{ab}
	DEX 组	15	0.27 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.03 ^{abc}	0.39 $\pm$ 0.05 ^{abc}	0.40 $\pm$ 0.04 ^{abc}
肺顺应性 ($\text{ml}/\text{cm H}_2\text{O}$)	C 组	15	0.55 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.06 ^a	0.43 $\pm$ 0.05 ^a	0.38 $\pm$ 0.07 ^a
	IR 组	15	0.53 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.24 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.14 $\pm$ 0.03 ^{ab}
	DEX 组	15	0.54 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.05 ^{abc}	0.36 $\pm$ 0.05 ^{abc}	0.31 $\pm$ 0.05 ^{abc}
灌注流量 (ml/min)	C 组	15	11.3 $\pm$ 1.1	9.3 $\pm$ 0.8 ^a	8.2 $\pm$ 0.9 ^a	6.6 $\pm$ 0.8 ^a
	IR 组	15	11.0 $\pm$ 0.9	5.3 $\pm$ 0.5 ^b	4.7 $\pm$ 0.6 ^{ab}	3.3 $\pm$ 0.5 ^{ab}
	DEX 组	15	10.9 $\pm$ 1.9	8.1 $\pm$ 0.7 ^{abc}	7.4 $\pm$ 0.8 ^{abc}	5.8 $\pm$ 0.6 ^{abc}
PaO_2 (mm Hg)	C 组	15	117.7 $\pm$ 6.6	94.6 $\pm$ 6.3 ^a	84.7 $\pm$ 7.4 ^a	74.7 $\pm$ 8.5 ^a
	IR 组	15	119.7 $\pm$ 8.3	66.5 $\pm$ 5.5 ^{ab}	58.5 $\pm$ 5.7 ^{ab}	47.6 $\pm$ 6.7 ^{ab}
	DEX 组	15	116.8 $\pm$ 7.4	85.2 $\pm$ 6.5 ^{abc}	75.4 $\pm$ 7.2 ^{abc}	67.4 $\pm$ 7.8 ^{abc}

注:与初灌 10 min 比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 IR 组比较,^c $P < 0.05$

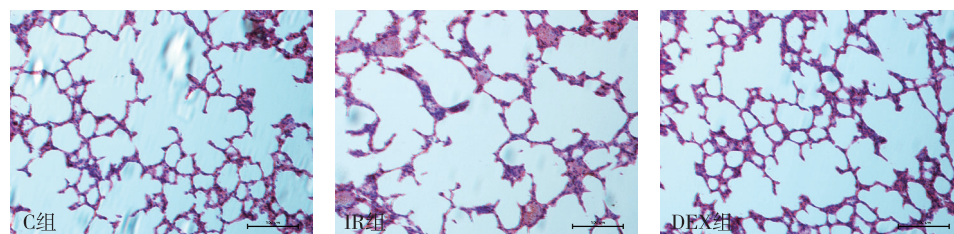


图 1 三组大鼠肺组织形态学(HE, ×200)

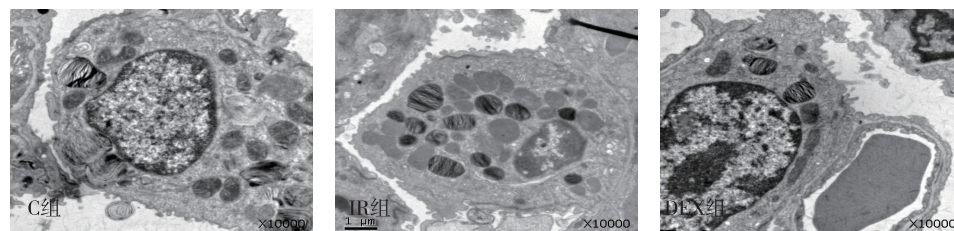


图 2 三组大鼠肺组织超微结构(透射电镜, ×10 000)

表 2 三组大鼠肺组织 W/D、IAR 及灌流液中 IL-6、IL-8 浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	肺组织 W/D	IAR(%)	IL-6 浓度(pg/ml)	IL-8 浓度(pg/ml)
C 组	15	5.3 ± 0.9	4.9 ± 1.7	31.3 ± 12.6	45.7 ± 23.5
IR 组	15	8.5 ± 1.2 ^a	31.8 ± 5.5 ^a	121.7 ± 34.3 ^a	228.6 ± 76.3 ^a
DEX 组	15	6.2 ± 1.0 ^{ab}	15.7 ± 3.7 ^{ab}	62.6 ± 21.7 ^{ab}	128.6 ± 48.5 ^{ab}

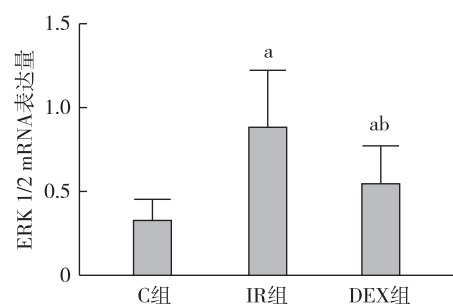
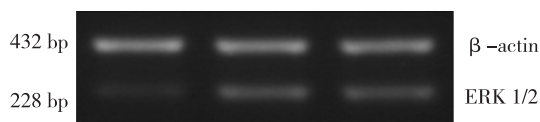
注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$ 注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 三组大鼠肺组织 ERK 1/2 mRNA 表达量的比较

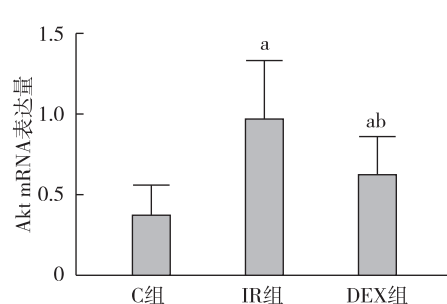
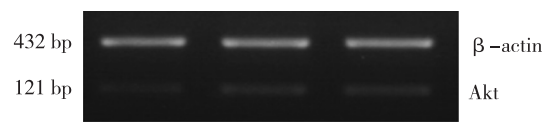
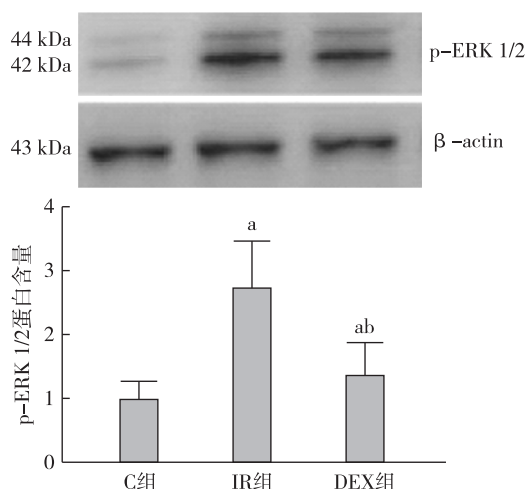
注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 三组大鼠肺组织 Akt mRNA 表达量的比较

作为缺血时间进行预实验,发现 60 min 为该模型的最佳缺血时间,LIRI 模型制备成功。采用 IL-2 系统制备大鼠 LIRI 模型时,游离心肺组织手术简单,手术创伤较小;且该系统采用负压通气方式,可模拟生理情况下肺的通气模式,能客观反映 LIRI

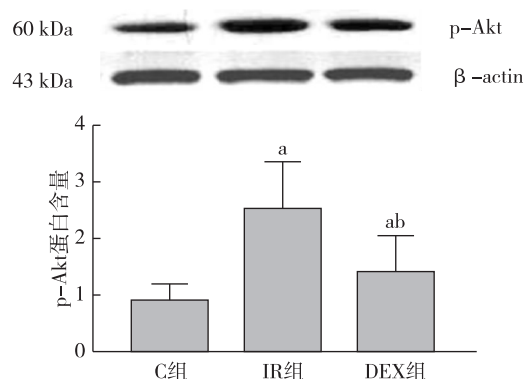
后的功能变化。

目前,炎性细胞因子(如 IL-6 和 IL-8)导致的损伤作用被认为是发生 LIRI 的重要原因之一^[8]。研究表明,IL-8 可诱导中性粒细胞聚集,引发炎性细胞因子的级联反应,最终引起 LIRI 发生^[9]。由于



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

图 5 三组大鼠肺组织 p-ERK 1/2 蛋白含量的比较



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

图 6 三组大鼠肺组织 p-Akt 蛋白含量的比较

IL-6 和 IL-8 在机体早期炎症反应中具有较高的敏感性和特异性,故本研究选取二者作为反映机体炎症反应程度的评价指标。本研究结果显示,肺组织中 IL-6、IL-8 的过度表达在大鼠离体 LIRI 时炎症反应中具有重要作用。右美托咪定可调节炎症反应,对缺血-再灌注损伤具有一定的治疗效果^[10]。本研究中,给予右美托咪定后,大鼠离体 LIRI 时肺组织中 IL-6、IL-8 水平明显下降,提示右美托咪定减轻离体 LIRI 的作用机制可能与其抑制 IL-6、IL-8 表达及减轻炎症反应有关。

Akt 的激活与急性肺损伤和中性粒细胞的趋化有关。研究表明,通过使用 ERK 抑制剂对 ERK 磷酸化抑制后可减轻炎症反应从而对肺部起到保护作用^[11]。在分子层面上,Akt 和 ERK 1/2 的激活在肺缺血-再灌注的炎症反应中具有重要的作用,且与 LIRI 机制可能具有密切关系^[2]。本研究结果表

明,右美托咪定对大鼠离体 LIRI 肺脏具有一定的保护作用,其机制可能为:ERK 1/2 和 Akt 在炎症反应中调节 IL-6、IL-8 的合成和分泌,而右美托咪定可能通过抑制 ERK 1/2 和 Akt 的激活而抑制 IL-6、IL-8 的表达。

综上所述,右美托咪定可通过抑制 IL-6、IL-8 表达来减轻大鼠离体 LIRI,其机制可能与其抑制 ERK 1/2 和 Akt 激活有关。

参 考 文 献

- [1] Dierich M, Tecklenburg A, Fuehner T, et al. The influence of clinical course after lung transplantation on rehabilitation success. *Transpl Int*, 2013, 26(3): 322-330.
- [2] Waldow T, Witt W, Ulmer A, et al. Preconditioning by inhaled nitric oxide prevents hyperoxic and ischemia/reperfusion injury in rat lungs. *Pulm Pharmacol Ther*, 2008, 21(2): 418-429.
- [3] Cai Y, Xu H, Yan J, et al. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*, 2014, 9(5): 1542-1550.
- [4] Pego-Fernandes PM, Werebe Ede C, Cardoso PF, et al. Experimental model of isolated lung perfusion in rats: technique and application in lung preservation studies. *J Bras Pneumol*, 2010, 36(4): 490-493.
- [5] Pego-Fernandes PM, Werebe E, Cardoso PF, et al. Experimental model of isolated lung perfusion in rats: first Brazilian experience using the IL-2 isolated perfused rat or guinea pig lung system. *Transplant Proc*, 2010, 42(2): 444-447.
- [6] 姚翔燕, 孟凡民, 张加强, 等. 右美托咪定预先给药对大鼠单肺通气时内质网应激诱导的细胞凋亡及 c-Jun 氨基末端激酶通路的影响. *中华麻醉学杂志*, 2015, 35(1): 114-118.
- [7] Okada H, Kurita T, Mochizuki T, et al. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts. *Resuscitation*, 2007, 74(3): 538-545.
- [8] Altemeier WA, Liles WC, Villagra-Garcia A, et al. Ischemia-reperfusion lung injury is attenuated in MyD88-deficient mice. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77123.
- [9] Chen W, Yang S, Ping W, et al. CYP2J2 and EETs protect against lung ischemia/reperfusion injury via anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(5): 2043-2054.
- [10] Cai Y, Xu H, Yan J, et al. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*, 2014, 9(5): 1542-1550.
- [11] Hsu JT, Kan WH, Hsieh CH, et al. Role of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) in 17beta-estradiol-mediated attenuation of lung injury after trauma-hemorrhage. *Surgery*, 2009, 145(2): 226-234.

(收稿日期:2017-09-02)