DOI:10.16016/j.1000-5404.201911107

右美托咪定调节巨噬细胞极化抑制肾缺血再灌注系统炎性反应

何心海,陈星同,杨子恒,古 丽,周 莉,全俊先,鲁开智,顾健腾 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院麻醉科

[摘要] **目的** 探讨右美托咪定(dexmedetomidine,Dex)对肾缺血再灌注损伤(renal ischemia reperfusion injury,rIRI)时系统炎性反应的影响和可能机制。**方法** 15只C57BL/6J小鼠分为3组(n=5),假手术组:行开腹关腹手术;肾缺血再灌注组:双侧肾蒂夹闭60 min;Dex预处理组:双侧肾蒂夹闭前15 min,腹腔注射Dex 25 μg/kg。术后或再灌注后24 h收集血液标本,血液分析仪检测中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞数目;制备血清,酶联免疫吸附测定测定IL-1β、TNF-α和IL-10水平;收集腹腔巨噬细胞并采用Western blot检测其极化状态相关标志蛋白iNOS和Arg 1。**结果** 与假手术组相比,肾缺血再灌注组中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞数目明显增多(P<0.01);血清中TNF-α、IL-1β水平明显增高(P<0.01);腹腔巨噬细胞M1型标志物iNOS表达明显增多(P<0.01),M2型标志物Arg 1表达减少(P<0.01)。与肾缺血再灌注组比较,Dex预处理组血液中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞数目无明显差异(P>0.05);血清中TNF-α、IL-1β水平降低(P<0.01),IL-10水平明显升高(P<0.01);腹腔巨噬细胞M1型标志物iNOS表达减少(P<0.05),M2型标志物Arg 1表达增多(P<0.05)。**结论** Dex抑制小鼠肾缺血再灌注所致系统炎性反应,其机制可能涉及调节巨噬细胞极性转化。

[关键词] 右美托咪定;肾缺血再灌注;巨噬细胞;极化

[中图法分类号] R364.12; R692; R971.2 [文献标志码] A

Dexmedetomidine inhibits systemic inflammatory response induced by renal ischemia reperfusion *via* mediating macrophage polarization

HE Xinhai, CHEN Xintong, YANG Ziheng, GU Li, ZHOU Li, QUAN Junxian, LU Kaizhi, GU Jianteng
Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of dexmedetomidine (Dex) on systemic inflammatory response induced by renal ischemia reperfusion (rIRI) and the possible mechanism. **Methods** Fifteen C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups, that is, sham operation group (laparotomy without renal pedicle occlusion), rIRI group (bilateral renal pedicles was clamped for 60 min with a microvascular clamp), and rIRI+Dex group (intraperitoneal injection of 25 μg/ml Dex in 15 min prior to bilateral renal ischemia). In 24 h after surgery or reperfusion, the blood samples were harvested and analyzed for counts of neutrophils, monocytes and lymphocytes by blood analyzer and for the serum levels of inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β and IL-10) by ELISA. Western blotting was used to detect iNOS and Arg 1 in the harvested peritoneal macrophages for the polarization. **Results** Compared with the mice in the sham group, the counts of neutrophils, monocytes and lymphocytes were significantly elevated (P<0.01), the serum levels of TNF-α and IL-1β were increased (P<0.01), and the expression of M1 marker iNOS was enhanced while that of M2

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81772050);重庆市基础和前沿研究基金(cstc2018jcyjAX0577)

[通信作者] 顾健腾, E-mail: gjt1976@163.com

marker Arg 1 was decreased ($P<0.01$). Dex pretreatment resulted in no significant changes in the counts of neutrophils, monocytes and lymphocytes ($P>0.05$), reduced serum levels of TNF-α and IL-1β ($P<0.01$) and increased level of IL-10 ($P<0.01$), and decreased expression of iNOS ($P<0.01$) as well as increase of Arg 1 ($P<0.05$) when compared with the indicators in the rIRI group. **Conclusion** Dex inhibits the systemic inflammatory response induced by rIRI, which may be associated with modulation of macrophage polarization.

[**Key words**] dexmedetomidine; renal ischemia reperfusion; macrophages; polarization

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81772050) and the Basic and Frontier Research Fund of Chongqing (cstc 2018jcyjAX0577). Corresponding author: GU Jianteng, E-mail: gjt1976@163.com

肾缺血再灌注所致急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)为临床常见急重症,AKI 造成的系统炎性反应常合并肾外远端其他脏器如脑、肺、心等受损,导致其死亡率居高不下[1]。围手术期 AKI 过度系统炎症反应与患者不良预后密切相关。采取措施预防和减轻 AKI 同时,减弱 AKI 所致系统炎性反应,改善肾外远端器官功能,具有重要临床价值。

右美托咪定(dexmedetomidine,Dex)是一类高选择性 α2 肾上腺素能受体(α2 adrenoceptor,α2AR)激动剂,具有镇静、镇痛、抗交感特性,常用于临床麻醉和重症监护室镇静治疗。近年研究表明其具有一定抗炎作用[2]并且可改善围术期患者预后[3-4]。我们前期研究结果证实,Dex 对肾缺血再灌注损伤具有肾保护作用,此外还能减轻其所导致的远端肺损伤[5-6]。巨噬细胞(macrophage,M)作为一种多功能细胞群体,可活化为促炎 M1 型与抗炎 M2 型[7],其两种表型在炎症的发生、发展及修复中发挥重要作用。Dex 的抗炎特性是否与其调节巨噬细胞极性转换相关并不清楚,故本研究将以动物肾缺血再灌注所致系统性炎症反应为病理模型,探索 Dex 对巨噬细胞极性转换的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 C57BL/6J 小鼠(20~22 g),购自陆军军医大学实验动物中心。动物实验获得陆军军医大学实验动物管理委员会许可,并严格遵从国家实验动物管理及使用指南的相关规定。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔抗鼠诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)一抗、山羊抗鼠精氨酸酶 1(arginase 1, Arg 1)一抗、驴抗兔二抗、驴抗山羊二抗均购自美国 Abcam 公司,兔抗鼠 GAPDH 一抗购自美国 CST 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)、洗膜缓冲液(TBST)、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜、增强型化学发光(Enhanced Chemiluminescent,ECL)显色液购自中国碧云天公司,小鼠 TNF-α、IL-1β、IL-10 ELISA 检测试剂盒购自美国 Abcam 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI1640 培养基购自美国 HyClone 公司,肝素钠购自江苏万邦生化医药公司,HEMAVET 950FS 血液分析仪购自美国 Drew Scientific 公司,GellDoc 2000 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司,多功能酶标仪购自美国 Thermofisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 动物术前禁食 12 h,自由饮水。15 只 C57BL/6J 小鼠分为 3 组,假手术组:行开腹关腹手术;肾缺血再灌注组:双侧肾蒂夹闭 60 min;Dex 预处理组:双侧肾蒂夹闭前 15 min,腹腔注射 Dex 25 μg/kg。实验动物处理的具体方法参照我们之前的研究[5-6]。

1.2.2 血液收集与血清制备 开腹手术或再灌注 24 h 后,行开胸心脏采血,同时制备抗凝血标本与非抗凝血标本。非抗凝血标本至于冰箱过夜后,4 ℃ 3 000×*g* 离心 15 min,取血清,-80 ℃保存备用。

1.2.3 腹腔巨噬细胞制备 心脏采血后,小鼠腹腔注射冰 PBS 5 mL,轻柔腹部,吸出腹腔液,300×*g* 离心 5 min,弃上清,并用含 15% FBS 的 RPMI1640 培养基清洗 2 遍后,接种于细胞培养皿中,细胞孵箱孵育 2 h 后,PBS 洗掉非贴壁细胞,所得细胞即为腹腔巨噬细胞,用于下一步实验。

1.2.4 血液中性粒,单核细胞,淋巴细胞的检测 将收集好的抗凝血标本使用 HEMAVET 950FS 动物血液分析仪上机分析,检测中性粒细胞,单核细胞,淋巴细胞的数目变化。

1.2.5 Western blot 法检测小鼠腹腔巨噬细胞表型 提取之前制备好的不同实验组腹腔巨噬细胞蛋白(单只小鼠的腹腔巨噬细胞为一个样本),测定总蛋白

浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳后转移蛋白至 0.2 μm PVDF 膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入兔抗鼠 iNOS 一抗和山羊抗鼠 Arg 1 一抗(1∶2 000);兔抗鼠 β-actin 抗体(1∶2 500),4 ℃过夜,TBST 清洗 3 遍。加入相应二抗,室温下摇床震荡孵育 2 h,TBST 再次清洗 3 遍后,滴加 ECL 显色液后,置于凝胶成像仪中显色,并用 Image J 软件进行灰度值测定。以目的基因条带灰度值与内参 GADPH 条带灰度值的比值反应目的基因表达水平。

1.2.6　ELISA 法检测小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-10 水平　按照试剂盒说明书操作检测各处理组相应炎性因子浓度。用酶标仪在 450 nm 波长下测定其光密度 $D(450)$,通过标准曲线计算血清中相应炎性因子的浓度。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　各组中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞数目变化

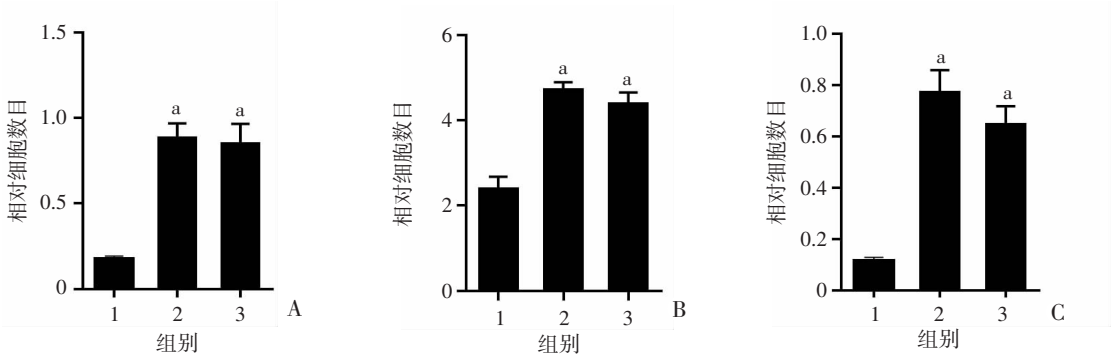
与假手术组相比,肾缺血再灌注组与 Dex 预处理组中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞数目均明显增加($P<0.01$,图 1)。与肾缺血再灌注组相比,Dex 预处理组没有改变中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞数目($P>0.05$,图 1)。

2.2　各组炎症因子变化

与假手术组相比,肾缺血再灌注组小鼠血清中促炎因子 TNF-α、IL-1β 显著增加($P<0.01$,图 2A、B);Dex 预处理后显著下调 TNF-α($P<0.05$,图 2A)与 IL-1β 水平($P<0.01$,图 2B),同时升高抗炎因子 IL-10 水平($P<0.01$,图 2C)。

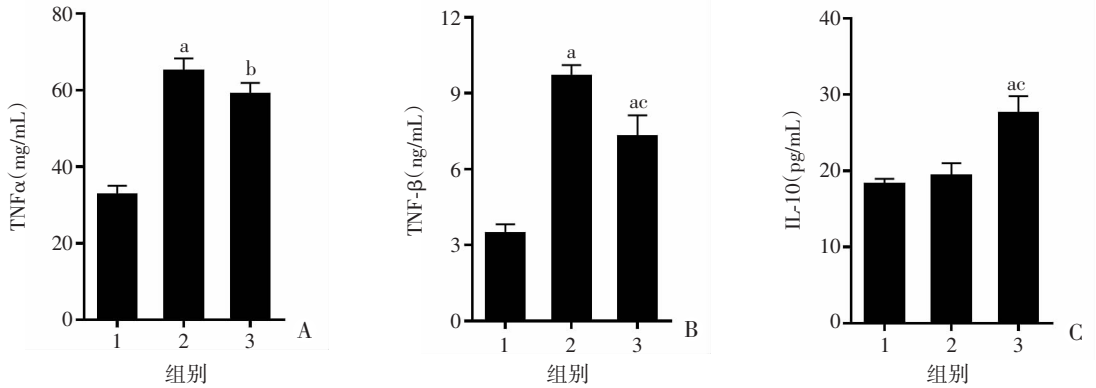
2.3　各组巨噬细胞极性变化

与假手术组相比,肾缺血再灌注组 iNOS 表达显著上升($P<0.01$,图 3A),同时 Arg 1 显著降低($P<0.01$,图 3B);Dex 预处理组显著减少 iNOS 的表达($P<0.05$,图 3A),同时显著增加 Arg 1 的表达($P<0.05$,图 3B)。



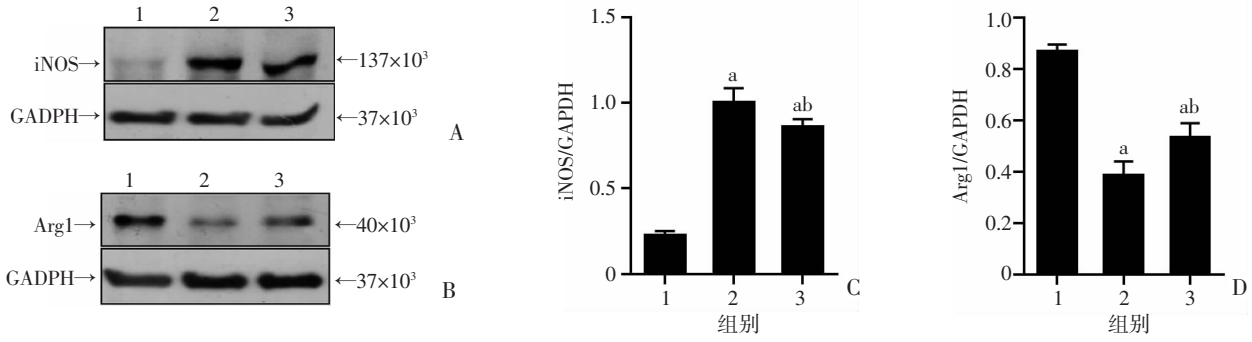
A:中性粒细胞;B:淋巴细胞;C:单核/巨噬细胞　1:假手术组;2:肾缺血再灌注组;3:Dex 预处理组　a:$P<0.01$,与假手术组组比较

图 1　rIRI 小鼠血中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞数目变化　($n=5$, $\bar{x}\pm s$)



A: TNF α;B:IL-1β;C:IL-10　1:假手术组;2:肾缺血再灌注组;3:Dex 预处理组　a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$; c:$P<0.01$,与肾缺血再灌注组比较

图 2　rIRI 小鼠血清炎症因子变化　($n=5$, $\bar{x}\pm s$)



A: Wstern blot 检测巨噬细胞 M1 的标志物 iNOS;B:Wstern blot 检测巨噬细胞 M2 的标志物 Arg 1;C:iNOS 表达半定量分析;D:Arg 1 表达半定量分析($n=5$, $\bar{x}\pm s$) 1:假手术组;2:肾缺血再灌注组;3:dex 预处理组 a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与肾缺血再灌注组比较

图 3 rIRI 小鼠腹腔巨噬细胞极性变化

3 讨论

围术期缺血再灌注所致 AKI 常见,住院患者 AKI 30%~40%发生于围术期[8]。尽管透析技术与治疗方法在过去数十年里改进不少,但与 AKI 相关的发病率和死亡率无明显改善[9]。AKI 常伴随肾外脑、肺、心、肝等多器官的病理性损伤和功能障碍,此为其死亡率居高不下的重要原因[1]。目前研究证实,AKI 所致系统性炎症反应为继发肾外器官受损的关键因素。巨噬细胞作为一种多功能免疫细胞群体,经不同刺激因素活化后可转化为 M1 型与 M2 型。M1 型高分泌 IL-1β、TNFα、IL-12,高表达一氧化氮合酶(iNOS)等,呈促炎功能活性;M2 型则高分泌 IL-10、IL-1ra,高表达精氨酸酶(Arg)等,呈抗炎与组织修复功能活性[7]。巨噬细胞的活化状态对炎症反应的启动、维持与消退,损伤组织器官的修复与重塑发挥了重要调控作用[10-12]。因此,采取措施调节巨噬细胞的极性转换,减少 M1 表型而增加 M2 表型,可成为抑制 AKI 所致系统炎性反应而实现肾外器官保护的一种治疗策略。

我们前期研究证实,临床麻醉和 ICU 中常用的 Dex 可通过抑制炎症反应而发挥肾保护及肺保护作用,但其抗炎的确切机制并不十分清楚[5-6,13]。最近的研究表明,腹腔巨噬细胞的活化状态对胆碱能抗炎通路的激活作用,进而调控炎症,与急性肾损伤程度密切相关[14]。本研究通过检测循环中性粒细胞、淋巴细胞、单核/巨噬细胞数目变化,发现 Dex 并不能改变肾缺血再灌注后上述免疫细胞数目升高的状况,但能使腹腔巨噬细胞的极性发生变化,M1 标志物 iNOS 表达减少,同时血清促炎因子 TNF-α、IL-1β 水平降低,而 M2 标志物 Arg1 表达增加,抗炎因子 IL-10 水平增高。Dex 抗炎而发挥的器官保护效应,还体现在神经系统及脓毒症多器官保护。QIAO 等[15]的动物实验证实,Dex 可显著抑制脓毒症大鼠炎症反应而改善其生存率;PANDHARIPANDE 等[16]的临床随机试验研究发现,脓毒症患者使用 Dex 镇静,相比于使用劳拉西泮镇静,其可显著降低神经损伤及 28 d 死亡率。结合本研究结果推测,Dex 在多种病理状况下所展现出的抗炎效应,很可能与其调节巨噬细胞极性转换即抑制 M1 而增加 M2 密切相关。

巨噬细胞极性转换是胞内众多分子事件和信号通路参与调控的结果,目前研究所涉及的信号通路包括 JNK、Notch、TGF-β、JAK/STAT、TLR/NF-κB、低氧依赖等,miRNA 参与了转录后的修饰调节,表观遗传和翻译后修饰也涉及巨噬细胞的极性调控[17-18]。巨噬细胞极性调控的确切机制仍不清楚,且未见到 α2AR 信号通路对巨噬细胞极性调控的相关研究。近年有研究表明 PI3K-Akt 通路在胶质瘤浸润小胶质细胞/巨噬细胞极性转换的调控中发挥作用,具体机制不明[19]。我们前期试验发现,α2AR 活化后激活胞内 PI3K/Akt 通路,增加 Akt 磷酸化而减轻氧糖剥夺诱导的人肾小管上皮细胞损伤[5]和肾缺血再灌注小鼠血清诱导的肺微血管内皮细胞凋亡[6]。此外,研究还证实活化肺微血管内皮细胞 α2AR 可进一步激活黏着斑激酶(FAK)而维持细胞骨架形态和细胞间连接的完整性,减轻 AKI 所致肺水肿[20]。FAK 是 PI3K/Akt 通路的上游信号因子[21],结合本研究所发现高选择性 α2AR 激动剂 dex 调控巨噬细胞极性转化,推测 α2AR/FAK/PI3K-Akt 是潜在的可外源干预调控的巨噬细胞极性转换信号通路,有待深入研究验证。

综上,本研究证实高选择性 α2AR 激动剂 Dex 可调控巨噬细胞极性转换,减少促炎 M1 型而增加抗炎 M2 型,减轻肾脏缺血再灌注所致系统炎性反应,在一

定程度上阐释 Dex 的抗炎机制。临床围术期应用 Dex,能否降低 AKI 及其所致肾外器官损伤发生率值得进一步探索。

参考文献:

[1] YAP S C, LEE H T. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence [J]. Anesthesiology, 2012, 116(5): 1139-1148. DOI: 10.1097/ ALN.0b013e31824f951b.

[2] LI B, LI Y L, TIAN S S, *et al*. Anti-inflammatory effects of perioperative dexmedetomidine administered as an adjunct to general anesthesia: A meta-analysis[J]. Sci Rep, 2015, 5: 12342. DOI: 10.1038/srep12342.

[3] JI F H, LI Z M, YOUNG N, *et al*. Perioperative dexmedetomidine improves mortality in patients undergoing coronary artery bypass surgery[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2014, 28(2): 267-273. DOI: 10.1053/j.jvca.2013.06.022.

[4] XIA Z Q, CHEN S Q, YAO X, *et al*. Clinical benefits of dexmedetomidine versus propofol in adult intensive care unit patients: a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. J Surg Res, 2013, 185(2): 833-843. DOI: 10.1016/j.jss.2013.06.062.

[5] GU J T, SUN P, ZHAO H L, *et al*. Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Crit Care, 2011, 15(3): R153. DOI: 10.1186/cc10283.

[6] LI J J, CHEN Q, HE X H, *et al*. Dexmedetomidine attenuates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury through α2AR/PI3K/Akt pathway[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 78. DOI: 10.1186/s12967-018-1455-1.

[7] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, *et al*. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.

[8] PARK J T. Postoperative acute kidney injury[J]. Korean J Anesthesiol, 2017, 70(3): 258. DOI:10.4097/kjae.2017.70.3.258.

[9] VA/NIH ACUTE RENAL FAILURE TRIAL NETWORK, PALEVSKY P M, ZHANG J H, *et al*. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury[J]. N Engl J Med, 2008, 359(1): 7-20. DOI: 10.1056/ NEJMoa0802639.

[10] JOHNSTON L K, RIMS C R, GILL S E, *et al*. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 47(4): 417-426. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0090OC.

[11] KRENKEL O, TACKE F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(5): 306-321. DOI: 10.1038/nri.2017.11.

[12] YIN J, VALIN K L, DIXON M L, *et al*. The role of microglia and macrophages in CNS homeostasis, autoimmunity, and cancer[J]. J Immunol Res, 2017, 2017: 5150678. DOI: 10.1155/2017/5150678.

[13] MA J B, CHEN Q, LI J J, *et al*. Dexmedetomidine-mediated prevention of renal ischemia-reperfusion injury depends in part on cholinergic anti-inflammatory mechanisms[J]. Anesth Analg, 2018. DOI: 10.1213/ANE.0000000000003820.

[14] INOUE T, ABE C, KOHRO T, *et al*. Non-canonical cholinergic anti-inflammatory pathway-mediated activation of peritoneal macrophages induces Hes1 and blocks ischemia/reperfusion injury in the kidney[J]. Kidney Int, 2019, 95(3): 563-576. DOI: 10.1016/j.kint.2018.09.020.

[15] QIAO H, SANDERS R D, MA D Q, *et al*. Sedation improves early outcome in severely septic Sprague Dawley rats[J]. Crit Care, 2009, 13(4): R136. DOI: 10.1186/cc8012.

[16] PANDHARIPANDE P P, SANDERS R D, GIRARD T D, *et al*. Effect of dexmedetomidine versus lorazepam on outcome in patients with sepsis: an a priori-designed analysis of the MENDS randomized controlled trial[J]. Crit Care, 2010, 14(2): R38. DOI: 10.1186/cc8916.

[17] MALYSHEV I, MALYSHEV Y. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage "Switch" phenotype[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 341308. DOI: 10.1155/2015/341308.

[18] MURRAY P J. Macrophage polarization[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 541-566. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.

[19] GRIMALDI A, D'ALESSANDRO G, GOLIA M T, *et al*. KCa3.1 inhibition switches the phenotype of glioma-infiltrating microglia/macrophages[J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2174. DOI: 10.1038/cddis.2016.73.

[20] CHEN Q, YI B, MA J B, *et al*. A2-adrenoreceptor modulated FAK pathway induced by dexmedetomidine attenuates pulmonary microvascular hyper-permeability following kidney injury[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 55990-56001. DOI: 10.18632/oncotarget.10809.

[21] FU Q F, LIU Y, FAN Y, *et al*. Alpha-enolase promotes cell glycolysis, growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through FAK-mediated PI3K/AKT pathway[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8: 22. DOI: 10.1186/s13045-015-0117-5.

(收稿:2019-11-13;修回:2020-01-10)

(编辑 王 红)