DOI:10.16016/j.2097-0927.202307096

不同浓度右美托咪定对大鼠心脏死亡后供体肾脏的影响

刘祥凤[1],薛正威[1],秦志刚[1],黎洁钰[1],李翼容[1],陈 林[1],李 鹏[2],顾健腾[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):第一附属医院麻醉科[1],药学与检验医学系生药学与中药学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 实验比较不同浓度右美托咪定(Dexmedetomidine,Dex)对大鼠心脏死亡后供体(donation after circulatory death,DCD)静态冷藏期肾脏的保护作用,从而探讨 Dex 适宜剂量。**方法** 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为(n=5):对照组(NC 组)、模型组(0 nmol/L Dex 组)和 6 个不同浓度 Dex 组(0.1、1、10、100、1 000、10 000 nmol/L Dex 组)。大鼠麻醉和肝素化后放血法处死。热缺血 30 min 时:NC 组灌注等体积的生理盐水,摘取肾脏、固定、-80 ℃保存;其余按分组浓度灌注含 Dex 的威斯康星大学器官保存液(University of Wisconsin solution,UW 液),摘取肾脏、并置于相应保存液 4 ℃保存 24 h 模拟供肾静态冷藏。光镜观察肾组织形态学变化,免疫组化法测定 Caspase-3 和肾组织损伤因子 1(kidney injury molecule-1,KIM-1)的表达水平,比色法测定 NAG 活力,羟胺法测定 T-SOD 活力、TBA 法测定 MDA 含量,RT-qPCR 检测炎症相关因子 IL-6、TNF-α 的 mRNA 扩增水平。**结果** ①与 NC 组比较:0 nmol/L Dex 组肾损伤评分、Caspase-3 和 KIM-1 水平、NAG 活力、MDA 含量和 IL-6 mRNA 扩增水平增加,T-SOD 活力降低(P<0.05)。②与 0 nmol/L Dex 组比较:100、1000 nmol/L Dex 组肾损伤评分显著降低[(1.33±0.26)分、(1.30±0.16)分 *vs* (2.14±0.34)分,P<0.05)];1、10、100、1 000 nmol/L Dex 组 KIM-1 的表达水平降低(P<0.05);100、1 000 nmol/L Dex 组 NAG 活力下降(P<0.05),Caspase-3 表达水平降低(P<0.05);1、10、100、1 000、10 000 nmol/L Dex 组 MDA 表达量降低(P<0.05);0.1、1、10、100、1 000 nmol/L Dex 组 IL-6 的 mRNA 水平降低(P<0.05);0.1、1、10、100、1 000、10 000 nmol/L Dex 组 TNF-α 的 mRNA 水平降低(P<0.05)。③与 0.1 nmol/L Dex 组比较:100、1 000 nmol/L Dex 组 KIM-1 的表达水平显著降低[(0.19±0.01)、(0.18±0.02) *vs* (0.25±0.02),P<0.05)],MDA 表达量显著降低(P<0.05);10、100、1 000 nmol/L Dex 组 IL-6、TNF-α 水平显著降低(P<0.05)。④与 1、10 nmol/L Dex 组比较:100、1 000 nmol/L Dex 组 TNF-α 水平降低(P<0.05)。⑤与 0、0.1、10 nmol/L Dex 组比较:1 000 nmol/L Dex 组 SOD 活力增加(P<0.05)。**结论** Dex 对大鼠 DCD 供肾的保护效应随浓度增加而增强,100、1 000 nmol/L Dex 剂量保护效果最佳;其机制可能涉及减少细胞凋亡、抑制炎症反应和抗氧化应激。

[**关键词**] 心脏死亡后供体;右美托咪定;肾移植;器官保护
[**中图法分类号**] R322.61; R617; R971.2 [**文献标志码**] A

Effects of dexmedetomidine at different concentrations on donor kidneys after cardiac death in rats

LIU Xiangfeng[1], XUE Zhengwei[1], QIN Zhigang[1], LI Jieyu[1], LI Yirong[1], CHEN Lin[1], LI Peng[2], GU Jianteng[1]
[1]Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital; [2]Department of Pharmacognosy and Traditional Chinese Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Amy Medical University (Third Military Medical Univerisity), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To compare the protective effects of dexmedetomidine (Dex) at different concentrations on donor kidneys from donation after circulatory death (DCD) in rats during static cold storage,

[**基金项目**] 重庆英才项目(CQYC20220303588);陆军军医大学人才基金(XZ-2019-505-028)
[**通信作者**] 顾健腾,E-mail:gjt1976@163.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and to investigate the appropriate dose of Dex in protection of donor kidneys of DCD. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into control group (NC group), model group (0 nmol/L Dex) and 6 dosed Dex groups (0.1, 1, 10, 100, 1 000 and 10 000 nmol/L), with 5 animals in each group. All rats were euthanized after anesthetization and intravenous injection of heparin. In 30 min after warm ischemia, renal perfusion was given with normal saline to the rats of the NC group, and with the University of Wisconsin organ preservation solution (UW solution) containing corresponding concentrations of Dex to the rest groups. In the NC group, the kidneys were harvested, fixed directly and stored at −80 ℃. The kidneys of the other groups were harvested after infusion of UW solution containing different concentrations of Dex and then stored in the corresponding preservation solution at 4 ℃ for 24 h to simulate static cold storage of donor kidneys. The morphological changes of renal tissues were observed by light microscopy. The expression levels of Caspase-3 and kidney injury molecule-1 (KIM-1) were determined by immunohistochemical staining. The MDA content, T-SOD activity and NAG level were determined by corresponding reagent kits. The mRNA levels of inflammation-related factors IL-6 and TNF-α were detected by real-time quantitative PCR. **Results** ① The 0 nmol/L Dex group had significantly increased renal injury score, Caspase-3 and KIM-1 levels, enhanced NAG activity, and elevated MDA content and IL-6 mRNA level, decreased T-SOD activity than the NC group ($P<0.05$). ② In comparison with the 0 nmol/L Dex group, the renal injury score was reduced in the 100 and 1 000 nmol/L groups (1.33±0.26 and 1.30±0.16 *vs* 2.14±0.34, $P<0.05$), the expression level of KIM-1 was declined in the 1, 10, 100 and 1 000 nmol/L Dex groups ($P<0.05$), NAG activity and Caspase-3 expression were decreased in the 100 and 1 000 nmol/L groups ($P<0.05$), decreased MDA content was observed in all dose groups except the 0.1 nmol/L Dex group($P<0.05$), decreased mRNA levels of IL-6 was in all dose groups except the 10 000 nmol/L Dex group($P<0.05$), and declined mRNA levels of TNF-α was seen in all dose groups ($P<0.05$). ③Compared with 0.1 nmol/L Dex group, the 100 and 1 000 nmol/L Dex groups had significantly decreased expression level of KIM-1 (0.19±0.01 and 0.18±0.02 *vs* 0.25±0.02, $P<0.05$) and content of MDA ($P<0.05$); the 10, 100 and 1 000 nmol/L Dex groups obtained reduced levels of IL-6 and TNF-α ($P<0.05$). ④ The level of TNF-α was obviously decreased in the 100 and 1 000 nmol/L Dex groups than the 1 and 10 nmol/L Dex groups ($P<0.05$). ⑤ SOD activity was notably enhanced in the 1 000 nmol/L Dex group than the 0, 0.1 and 10 nmol/L Dex groups ($P<0.05$). **Conclusion** Dex shows protective effects on rat DCD donor kidneys in a dose-dependent manner, with the doses of 100 nmol/L and 1 000 nmol/L exerting the optimal effects, which may be due to its reducing apoptosis, inhibiting inflammatory response and anti-oxidative stress.

[**Key words**] donation after circulatory death; dexmedetomidine; kidney transplantation; organ protection

Supported by the Chongqing Talent Foundation (CQYC20220303588) and the Talent Foundation of Army Medical University (XZ-2019-505-028).
Corresponding author: GU Jianteng, E-mail: gjt1976@163.com

肾移植是终末期肾衰竭患者的最佳治疗选择[1-2]。然而,供体器官短缺仍是全球亟待解决的重大医疗问题[3]。因此在供体器官严重缺乏的背景下,拓展心脏死亡后供体(donation after circulatory death, DCD)的应用能在一定程度上缓解器官移植来源不足的状况,扩大供体池[4]。但是 DCD 供体因热缺血时间长限制了其临床应用,发生移植物短期和长期功能障碍的风险增加[5]。因此,任何提高 DCD 供体保存质量的策略均有利于扩大器官移植供体库,同时也将有助于改善移植器官术后功能。右美托咪定(Dexmedetomidine,Dex)是一种高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂,能通过减少炎症反应,抗氧化应激,激活抗凋亡信号通路减轻缺血再灌注损伤,进而保护细胞,并对神经系统、心、肺、肾、肝、小肠等多种器官具有保护作用[6]。故本研究通过构建大鼠 DCD 供肾模型,在常用器官保存液(威斯康星大学器官保存液,University of Wisconsin solution,UW 液)中添加不同浓度 Dex,探索不同浓度 Dex 对 DCD 供肾的保护作用及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~7 周龄健康清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 180~200 g,购自陆军军医大学实验动物中心。所有动

物实验经过大学实验动物福利伦理审查委员会批准,并获得动物伦理证明(AMUWEC20224009),动物实验的操作过程符合动物伦理和动物福利要求。

1.2 药品与试剂

Dex 购自美国 sigma 公司;UW 液购自美国器官修复医疗科技股份有限公司;肾组织损伤因子 1(kidney injury molecule-1,KIM-1)一抗购自武汉博士德生物工程有限公司;丙二醛(MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase,NAG)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;注射用苯巴比妥钠购自福建省闽东力捷迅药业有限公司;肝素钠注射液购自常州千红生化制药股份有限公司;Caspase-3 一抗和 HE 染色试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司;链霉卵白素-生物素免疫组化检测试剂盒、DAB 显色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;反转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自南京诺唯赞(vazyme)生物科技股份有限公司。

1.3 仪器与耗材

手术器械购自山东新华手术器械有限公司;灭菌离心管购自浙江硕华生命科学研究股份有限公司;酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;移液器购自北京大龙兴创实验仪器公司;电动吸引器购自江苏鱼跃医疗设备股份有限公司;正置荧光显微镜购自德国 ZEISS 公司;PCR 仪购自成都百乐科技有限公司;高速冷冻离心机购自 Eppendorf 中国有限公司。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 8 组($n=5$):对照组(NC 组)、模型组(0 nmol/L Dex 组)和 6 个不同浓度 Dex 组(0.1、1、10、100、1 000、10 000 nmol/L)。NC 组大鼠 DCD 供肾(热缺血 30 min)获取后部分直接 4%多聚甲醛固定,一部分-80 ℃保存,不经过冷保存 24 h。其余组 DCD 供肾分别经含相应浓度 Dex 的 UW 液冷保存 24 h,一部分固定,一部分-80 ℃保存。

1.4.2 大鼠 DCD 供体肾脏模型构建和静态冷藏 大鼠禁食水 12 h 后腹腔注射 1%苯巴比妥钠 1 mL,待其麻醉后固定于操作台上。股静脉注射肝素(312.5 U/mL)0.5~0.6 mL 行全身肝素化,等待 5 min。暴露切开颈动脉(放血法处死大鼠),利用吸引器于此处吸血,死亡时开始记录热缺血时间。开胸开腹暴露腹主动脉、肾脏,剪开右心耳,待热缺血 30 min 时用 24 G 留置针经腹主动脉插入肾动脉开始灌注肾脏(肾脏的灌注压力约为 40 mmHg,流速为 20 mL/min):NC 组肾脏灌注 5 mL 生理盐水;其余组灌注相应器官保存液(0~4 ℃)5 mL。NC 组摘取肾脏后剥去包膜,一侧肾脏直接 4%多聚甲醛固定,另一侧肾脏置于-80 ℃冰箱保存,未经历冷保存 24 h。其他各组灌注保存液后将剥去包膜的肾脏置于含相应浓度 Dex 的保存液中 4 ℃保存 24 h。冷藏后的肾脏部分用 4%多聚甲醛固定,用于石蜡包埋、HE 染色和免疫组化,部分置于-80 ℃冰箱保存,用于 SOD、MDA、NAG、q-PCR 检测。

1.4.3 肾脏组织病理学观察 肾脏经固定后行石蜡包埋切片(4 μm),脱蜡和 HE 染色,于光镜下观察肾皮质病理学结果。每张切片随机选取 10 个不重复视野,采用双盲法行组织损伤评分,并计算样本平均值。根据 Banff 标准[7],对肾皮质损伤进行 0~4 级评分。根据肾小管损伤的严重程度进行半定量评分[7-8]:无损伤记 0 分,≤25%为轻度记 1 分,26%~50%为中度记 2 分,51%~75%为重度记 3 分,>75%为极重度记 4 分。

1.4.4 免疫组化法检测肾组织 Caspase-3 和 KIM-1 的表达 石蜡切片于 60 ℃烘箱烤片 2 h,依次经新鲜二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ各 10 min,无水乙醇Ⅰ、无水乙醇Ⅱ、95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精各 5 min 脱蜡至水,PBS 清洗 5 min。采用 EDTA(pH=8.0)抗原修复液于高压锅内热修复 5 min,自然冷却后 3%双氧水封闭内源性过氧化氢酶室温 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,10%牛血清白蛋白和 10%山羊血清封闭内源性抗原,室温 60 min。后分别滴加 Caspase-3 一抗(1∶200)、KIM-1 一抗(1∶200),4 ℃ 孵育过夜,复温 0.5 h,滴加二抗(生物素标记山羊抗兔 IgG)室温孵育 15 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育 15 min,DAB 显色、苏木精复染后依次分化、反蓝、脱水,滴加中性树胶封片。于光镜下观察并采集图片,Image J 软件进行灰度计算与半定量分析(AOD=IOD/Area)。

1.4.5 肾脏组织中 NAG、T-SOD、MDA 测定 将肾组织从-80 ℃冰箱中取出,称取 20 mg 后通过在研钵内加液氮的方法研磨肾组织,再加入 0.9% 的生理盐水,制备成浓度约为 10%的匀浆液,立即放入高速冷冻离心机离心 10 min 后取上清液,分别按照试剂盒说明书操作,采用比色法测定 NAG 活力,羟胺法测定 T-SOD 活力、TBA 法测定 MDA 含量。

1.4.6 RT-qPCR 法测定 IL-6 mRNA 和 TNF-α mRNA 扩增水平 用总 RNA 提取试剂盒提取肾组织的 RNA,使用超微量分光光度计确认 RNA 样品的纯度和浓度,重复测量 3 次取平均值。RNA 样品按反转录第一链 cDNA 合成试剂盒(HiScript® Ⅲ RT SuperMix for

qPCR)说明书配制反转录反应体系,离心混匀后进行反转录反应合成 cDNA。按照 qPCR 试剂盒说明书(*Taq* Pro Universal SYBR qPCR Master Mix)以 cDNA 为模板配制 PCR 反应体系,离心混匀,扩增反应条件:95 ℃,3 min;95 ℃,15 s,60 ℃,30 s,40 个循环。以采集到的循环阈值(Ct 值)作为统计数据,*GAPDH* 为内参基因,使用表达倍数= $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算各组目的基因相对表达水平。本研究所使用的引物序列见表 1。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 Graph Pad Prism 8 软件进行统计分析和作图,数据分析采用单因素方差分析(ANOVA)、Turkey 多重比较,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

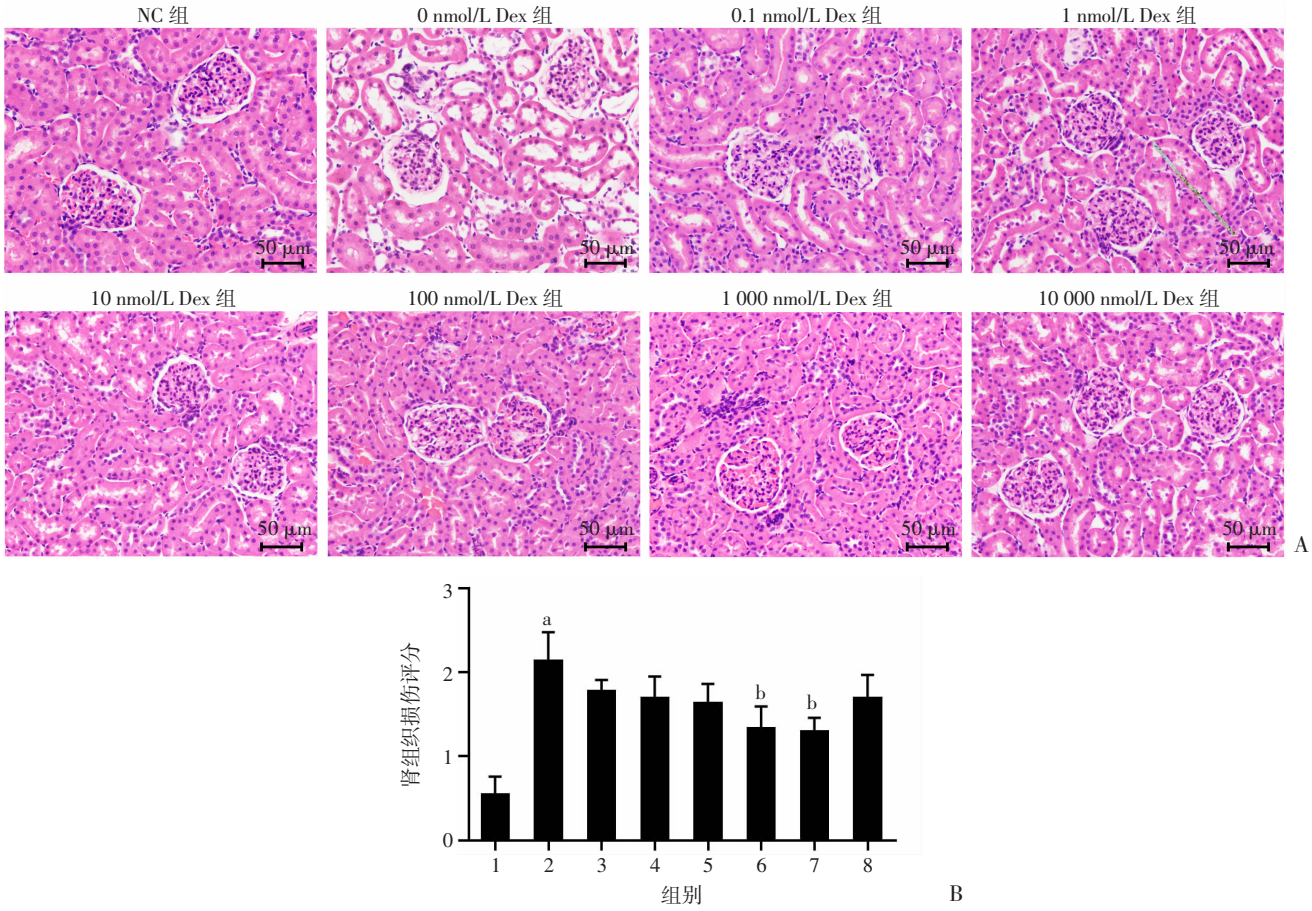
2 结果

2.1 各组肾脏病理形态学变化

HE 染色显示:NC 组结构保存完好,肾小管、肾小球形态与组织结构清晰,核仁清晰,细胞质染色均匀,肾小球壁层(单层扁平细胞)和脏层足细胞完整连续,未见肾小管明显扩张。冷保存 24 h 后的肾脏部分肾小球壁层和脏层细胞完整性被破坏,肾小管扩张。其他各组肾组织损伤评分较之 NC 组增加;与 0 nmol/L Dex 组(肾损伤评分 2.14±0.34)比较,100 nmol/L Dex 组和 1 000 nmol/L Dex 组肾组织损伤评分分别降低至(1.33±0.26)和(1.30±0.16),差异有统计学意义($P<0.05$,图 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列(3′—5′)

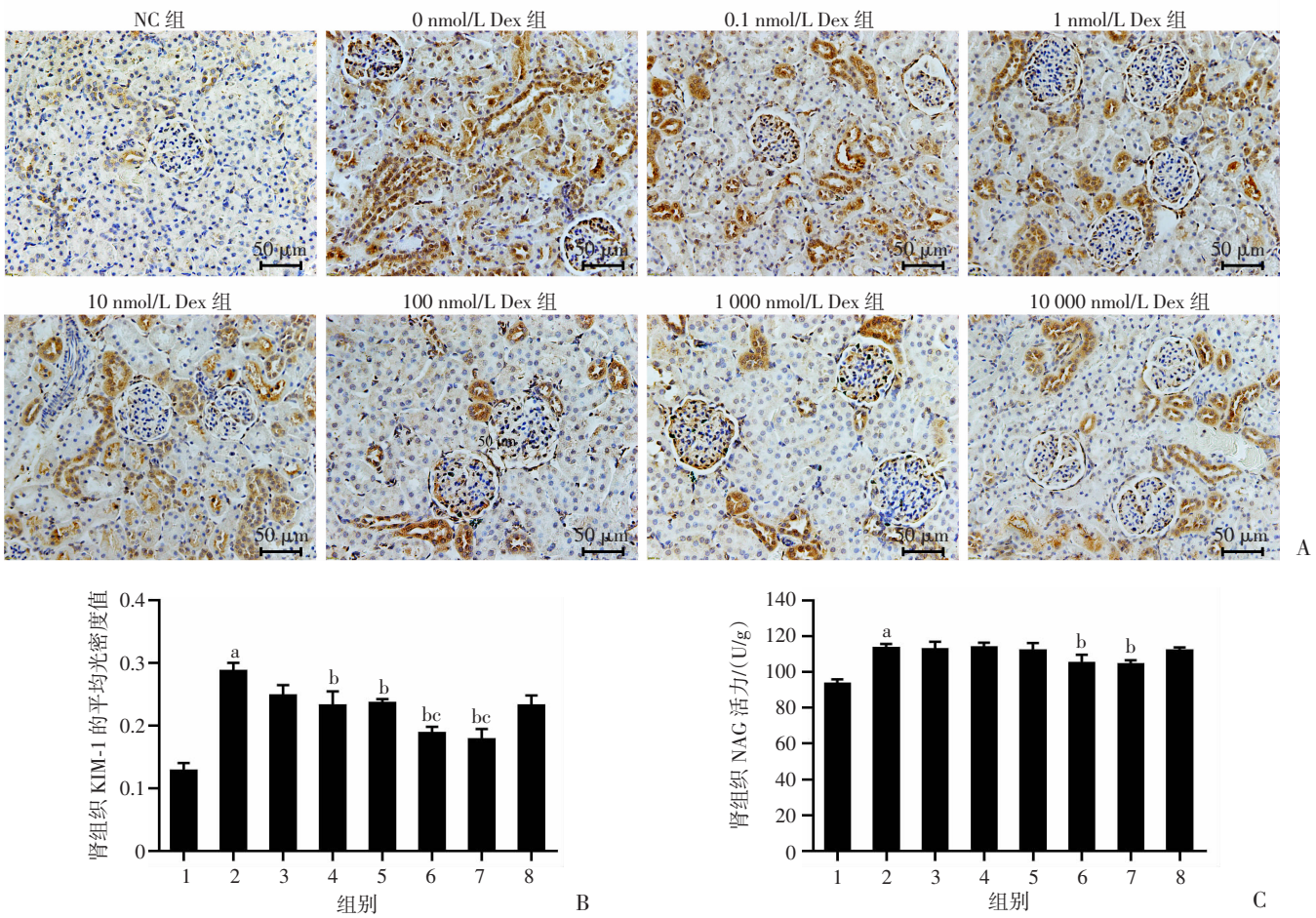
引物	上游序列	下游序列
GAPDH	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT
IL-6	AACAGCCAACGAATCCCAGAC	TTGTTTTTACAGGAGAGGGTAGACA
TNF-α	TCAGTTCCATGGCCCAGAC	GTTGTCTTTGAGATCCATGCCATT



A:肾脏病理学观察;B:肾组织损伤评分($n=5,\bar{x}\pm s$)

1:NC 组;2:0 nmol/L Dex 组;3:0.1 nmol/L Dex 组;4:1 nmol/L Dex 组;5:10 nmol/L Dex 组;6:100 nmol/L Dex 组;7:1 000 nmol/L Dex 组;8:10 000 nmol/L Dex 组;a:$P<0.05$,与 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 0 nmol/L Dex 组比较

图 1 各组大鼠肾脏病理学观察及损伤评分



A:免疫组化检测 KIM-1 表达;B:KIM-1 的平均光密度值;C:NAG 活力

1: NC 组; 2: 0 nmol/L Dex 组; 3:0.1 nmol/L Dex 组; 4:1 nmol/L Dex 组; 5:10 nmol/L Dex 组; 6:100 nmol/L Dex 组; 7:1 000 nmol/L Dex 组; 8:10 000 nmol/L Dex 组;a: $P<0.05$,与 NC 组比较;b: $P<0.05$,与 0 nmol/L Dex 组比较;c: $P<0.05$, 与 0.1 nmol/L Dex 组比较

图 2 各组大鼠肾脏组织 KIM-1 和 NAG 表达水平比较 ($n=4,\bar{x}\pm s$)

2.2 各组肾脏组织 KIM-1 和 NAG 的表达情况

免疫组化结果显示:KIM-1 的表达主要分布于肾小管。与 NC 组比较,经冷缺血 24 h 后其余各组肾组织 KIM-1 的表达量增加。与 0 nmol/L Dex 组比较,1、10、100 和 1 000 nmol/L Dex 组肾组织 KIM-1 的表达量显著降低($P<0.05$);与 0.1 nmol/L Dex 组比较,100、1 000 nmol/L Dex 组肾组织 KIM-1 的表达量降低($P<0.05$),见图 2A、B。经比色法测定 NAG 活力显示:与 NC 组比较,0 nmol/L Dex 组的 NAG 活力增加($P<0.05$);与 0 nmol/L Dex 组比较,100、1 000 nmol/L Dex 组 NAG 活力降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2C。

2.3 免疫组化检测各组肾脏细胞凋亡情况

免疫组化结果显示,Caspase-3 的表达分布于肾小球和肾小管。与 NC 组比较,经冷缺血 24 h 后其余各组肾组织 Caspase-3 的表达量均增加。与 0 nmol/L Dex 组比较,100、1 000 nmol/L Dex 组肾组织 Caspase-3 的表达量显著降低($P<0.05$);与 10 nmol/L Dex 组比较,1 000 nmol/L Dex 组肾组织 Caspase-3 的表达量降低($P<0.05$),见图 3。

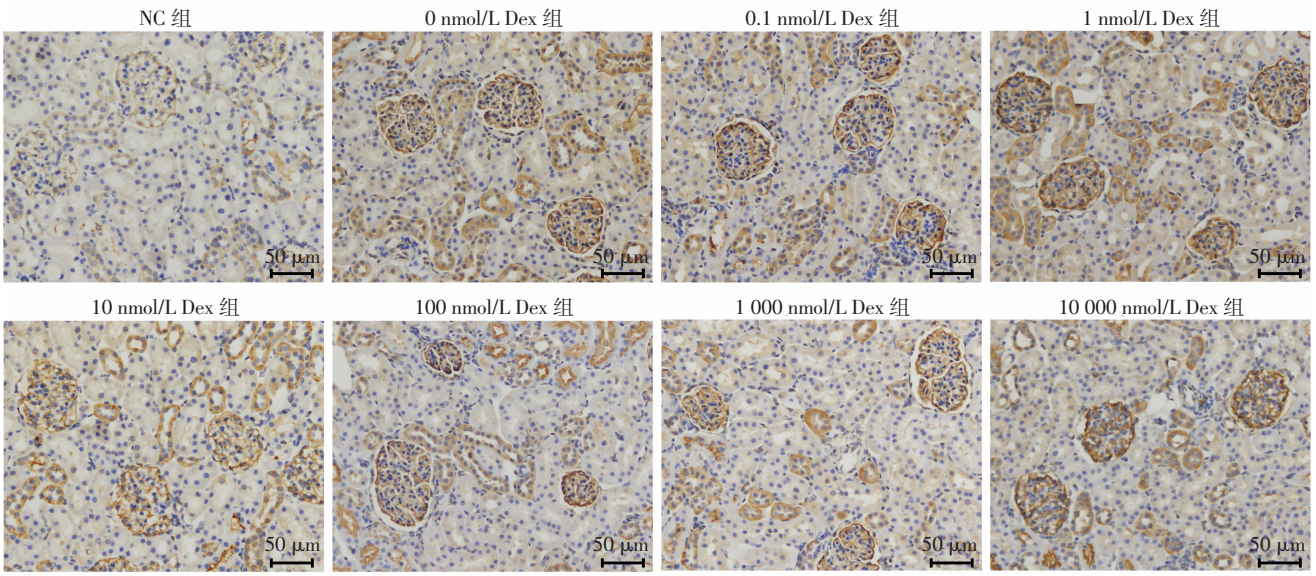
2.4 各组肾脏组织总 SOD 活力和 MDA 含量的变化

与 NC 组比较:经冷缺血 24 h 后其余各组肾组织总 SOD 活力降低。与 0、0.1、10 nmol/L Dex 组比较,1 000 nmol/L Dex 组肾组织总 SOD 活力增加,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4A)。经冷缺血 24 h 后其余各组肾组织 MDA 含量较 NC 组增加。与 0 nmol/L Dex 组比较:1、10、100、1 000 和 10 000 nmol/L Dex 组肾组织 MDA 含量降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 0.1 nmol/L Dex 组比较:100、1 000 nmol/L Dex 组肾组织 MDA 含量降低($P<0.05$,图 4B)。

2.5 各组肾脏组织 IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 的变化

RT-qPCR 检测结果提示(图 5):与 NC 组比较,0 nmol/L Dex 组肾组织 IL-6 的 mRNA 表达增加($P<0.05$)。与 0 nmol/L Dex 组比较:0.1、1、10、100 和

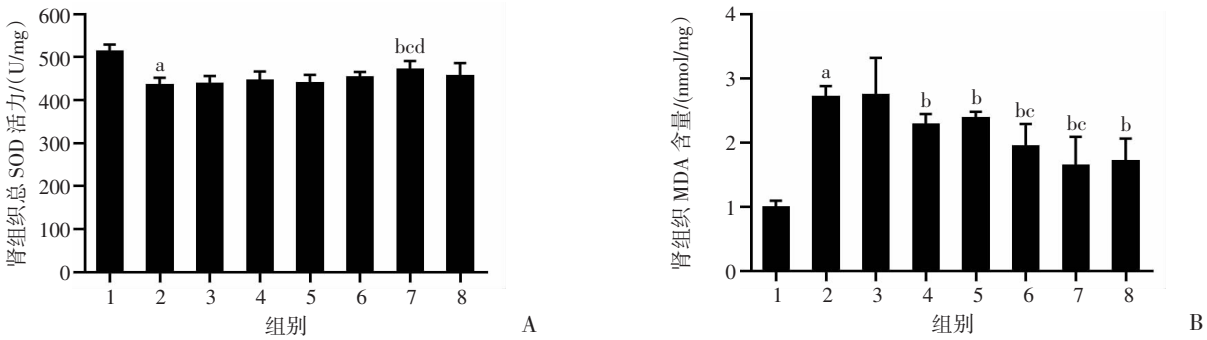
1 000 nmol/L Dex 组 IL-6 的 mRNA 表达显著降低($P<0.05$),所有不同浓度 Dex 组 TNF-α 的 mRNA 表达显著降低($P<0.05$)。与 0.1 nmol/L Dex 组比较:10、100 和 1 000 nmol/L Dex 组 IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 表达量降低($P<0.05$)。与 1 nmol/L Dex 组比较:10、100 和 1 000 nmol/L Dex 组 TNF-α 的 mRNA 表达降低($P<0.05$)。与 10 nmol/L Dex 组比较:100、1 000 nmol/L Dex 组 TNF-α 的 mRNA 表达降低($P<0.05$)。



A:免疫组化检测 Caspase-3 表达;B:Caspase-3 的平均光密度值

1: NC 组; 2: 0 nmol/L Dex 组; 3:0.1 nmol/L Dex 组; 4:1 nmol/L Dex 组; 5:10 nmol/L Dex 组; 6:100 nmol/L Dex 组; 7:1 000 nmol/L Dex 组; 8:10 000 nmol/L Dex 组;a: $P<0.05$,与 NC 组比较;b: $P<0.05$,与 0 nmol/L Dex 组比较;c: $P<0.05$,与 10 nmol/L Dex 组比较

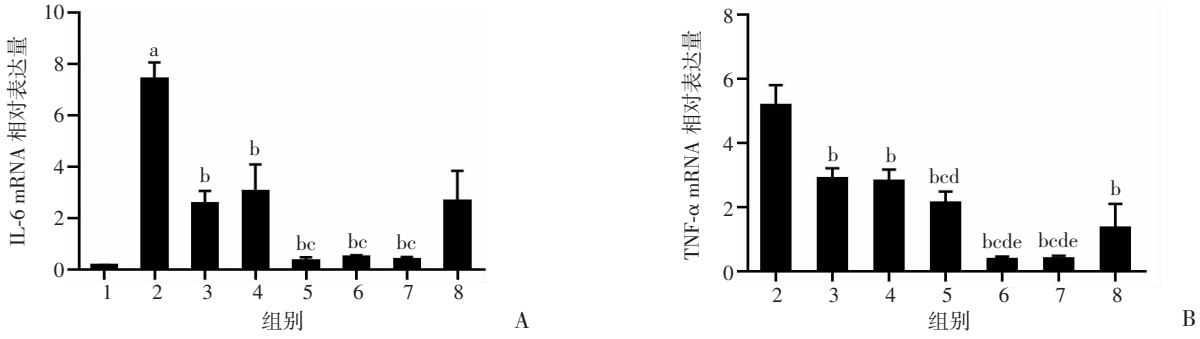
图 3 各组大鼠肾脏组织 Caspase-3 表达水平比较 ($n=4, \bar{x}\pm s$)



A:总 SOD 活力;B:MDA 含量

1: NC 组; 2: 0 nmol/L Dex 组; 3:0.1 nmol/L Dex 组; 4:1 nmol/L Dex 组; 5:10 nmol/L Dex 组; 6:100 nmol/L Dex 组; 7:1 000 nmol/L Dex 组; 8:10 000 nmol/L Dex 组;a: $P<0.05$,与 NC 组比较;b: $P<0.05$,与 0 nmol/L Dex 组比较;c: $P<0.05$,与 0.1 nmol/L Dex 组比较;d: $P<0.05$,与 10 nmol/L Dex 组比较

图 4 各组大鼠肾脏组织总 SOD 和 MDA 表达水平比较 ($n=4, \bar{x}\pm s$)



A:IL-6;B:TNF-α

1: NC 组; 2: 0 nmol/L Dex 组; 3:0.1 nmol/L Dex 组; 4:1 nmol/L Dex 组; 5:10 nmol/L Dex 组; 6:100 nmol/L Dex 组; 7:1 000 nmol/L Dex 组; 8:10 000 nmol/L Dex 组; a: $P<0.05$, 与 NC 组比较;b: $P<0.05$, 与 0 nmol/L Dex 组比较;c: $P<0.05$, 与 0.1 nmol/L Dex 组比较;d: $P<0.05$, 与 1 nmol/L Dex 组比较;e: $P<0.05$, 与 10 nmol/L Dex 组比较

图 5 各组大鼠肾脏组织 IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 表达水平比较 ($n=4, \bar{x}\pm s$)

3 讨论

3.1 DCD 供体应用背景及意义

器官移植被认为是治疗各种器官(如肾、肝、肠、心和肺等)终末期疾病的成功方法[9]。但供体器官严重短缺使器官移植受到很大限制[10]。为缓解供体器官的供需严重不平衡,DCD 供体器官的使用正在逐渐增加。然而 DCD 供体器官热缺血时间较长,发生移植物原发性无功能(primary non-function,PNF)和功能延迟(delayed graft function,DGF)的比例较高[11]。因此,任何提高 DCD 供体保存质量和利用率的有效策略,是解决供体器官缺乏的重要手段,有利于扩大供体库,改善移植后的移植物功能,从而使更多的终末期器官疾病患者得到器官移植的机会,具有重要的现实意义。DCD 多为车祸、创伤等意外因素所致,故器官热缺血时间较长,器官远距离运输及冷藏保存可进一步加重供体器官损伤。根据《中国移植器官保护专家共识(2016 版)》[12]:在无血压情况下,热缺血时间>20 min 则肾移植效果较差,供肾可接受热缺血时间一般不超过 60 min,肾脏冷保存时间不超过 24 h。据此,本研究所建立的 DCD 供肾模型选择热缺血 30 min,冷缺血时间 24 h。

3.2 研究结果及原因分析

本研究通过建立大鼠 DCD 供肾模型,将肾脏置于含不同浓度 Dex 的保存液中冷保存 24 h,模拟 DCD 供肾静态冷藏状态。在构建 DCD 供肾模型中,心脏停搏后相关的缺氧和低血压导致全身血流动力学紊乱和代谢异常,可能导致热缺血期间的细胞损伤。此外,静态冷藏期间细胞代谢减缓但并不停止,腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)需求过程仍在继续,静态冷藏可能进一步加重热缺血引起的肾损伤[13]。本研究结果显示,大鼠 DCD 供肾经热缺血 30 min 后再静态冷藏 24 h,引起了供体肾脏不同程度的结构损伤,包括肾小管扩张,刷状缘脱落或消失,核染色部分消失。Dex 干预后可降低肾组织损伤评分,以 100、1 000 nmol/L Dex 组形态学组织结构保存更佳。

判断肾脏损伤常采用血肌酐、尿素氮、肾小球滤过率、尿常规、渗透压等几项指标,但多数情况下当这些指标增高时,很多肾脏损害已经非常严重或已产生了不可逆的损伤,这些显然不是早期发现肾脏损伤的敏感指标。肾损伤分子 1(kidney injury molecule-1,KIM-1)是一种 I 型跨膜蛋白,具有免疫球蛋白和粘蛋白结构域,在缺血后肾近端小管中表达明显上调[14]。正常情况下,肾脏组织几乎不表达 KIM-1 蛋白,但是在肾脏损伤后数小时内 KIM-1 的表达水平即显著升高。在检测到估算肾小球滤过率改变之前,KIM-1 已被证明是肾损伤的良好预测指标,KIM-1 上调是肾近端肾小管损伤的公认结果[15]。N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)是一种细胞内溶酶体糖苷酶,可催化糖脂和糖蛋白中末端葡萄糖残基的水解,组织损伤时 NAG 的快速升高和稳定性使其成为各种病理状况早期诊断和严重程度评估的敏感临床标志物[16]。KIM-1 联合 NAG 酶检测早期急性肾损伤,具有准确性高、特异性好、假阳性率低等优点,因此本研究选择这两项指标评估肾损伤。本研究发现 KIM-1、NAG 的检测结果与前述形态学表现一致。

Dex 作为 α_2 肾上腺素能受体(α_2AR)激动剂,据报道 Dex 可以通过减少氧化应激、抑制炎症反应[17-19],

抗凋亡[18,20]减轻缺血再灌注损伤,对细胞提供保护作用。缺血再灌注损伤是器官移植过程中不可避免的损伤[21-22]。本课题组前期研究也已证实,Dex 可改善肾缺血再灌注损伤[23];Dex 可激活 PI3K-Akt 信号通路抑制肺细胞凋亡,减轻肾缺血再灌注所致急性肺损伤[20];Dex 除了直接作用于 α_2AR 外,还通过副交感神经系统激活的抗炎作用,减轻缺血再灌注损伤后的肾损伤,提供肾脏保护效果[24]。据此,本研究在探索 Dex 对 DCD 供肾保护作用的机制中选择了细胞凋亡、氧化应激和炎症反应的关键信号分子进行检测验证。

细胞凋亡标志物 Caspase-3 是一种促凋亡蛋白[25]。超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)是评价氧化应激过程中使用最多的两个指标。SOD 催化超氧阴离子分解为氧(O_2)和过氧化氢(H_2O_2),是一种生物体内清除超氧阴离子自由基的重要的抗氧化酶,有效地去除活性氧,保护细胞免受氧自由基的损害,维持活性氧的正常代谢[26]。MDA 是脂质与氧自由基反应形成的产物之一,其含量代表脂质过氧化的程度。SOD 与 MDA 分别作为评价氧化应激在抗氧化能力和氧化能力方面的重要指标[27]。研究发现 Dex 通过抑制 ROS / JNK 途径减少细胞凋亡和抗氧化应激,下调 Bax,细胞色素 C,Caspase-9 和 Caspase-3 的表达,减少 MDA、活性氧(ROS)的产生和提高 SOD 活力,从而防止大鼠急性应激引起的肾损伤[28]。本研究显示 Dex 可减轻 DCD 供肾的细胞凋亡和抗氧化应激,以 100 nmol/L Dex 和 1 000 nmol/L Dex 组较为显著。TNF-α、IL-1β 和 IL-6 是最常用的促炎细胞因子[29]。TNF-α 和 IL-6 的释放可进一步加剧促炎反应,加重细胞的损伤。研究发现,Dex 预处理可减轻大鼠原位自体肝移植后急性肾损伤,通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 通路激活,减少促炎因子 TNF-α 和 IL-1β 的释放,降低尿素和 SCr 水平,有肾脏保护作用[30]。胰肾同时移植患者术中持续输注 Dex,Dex 通过减少炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的释放来减轻对术后的心肌损伤[31]。本研究显示 Dex 可降低促炎因子 TNF-α 和 IL-6 的表达,炎症因子随 Dex 浓度的增加而降低,但在 10 000 nmol/L 时未见进一步降低。这些结果表明,Dex 对 DCD 供肾发挥器官保护效应的机制涉及抑制细胞凋亡、氧化应激和炎症反应。且 Dex 对肾脏保护是剂量依赖性的,这与以前的报道一致。

3.3 Dex 的作用机制及在肾移植中的临床应用

Dex 是目前临床应用的一种高选择性 α_2AR 激动剂,激活 α_2AR 是发挥器官保护作用的主要机制。Dex 与 G 蛋白(G 蛋白由 α、β 和 γ 三个亚基组成)偶联,通过细胞内不同信号传导机制,产生不同的效应。激活腺苷酸环化酶的 G 蛋白被称为 Gs,其他抑制剂称为 Gi。Dex 主要与 Gi 结合,一方面,通过 Gαi 蛋白直接抑制 AC-cAMP-PKA 通路[32];另一方面,Gβ、Gγ 亚基与 Gαi 分离激活 PI3K/Akt 通路,影响 MEK/ERK、HGMB1/TLR4/NFκB 等一系列下游信号通路[33-34]。但在高浓度的激动剂和高受体表达情况下,Dex 可能与 Gs 偶联,产生相反的生理效应[6]。因此本研究结果显示随着 Dex 浓度增加呈现出双相效应,太高浓度 Dex 的保护效果无进一步增加或效果变差。

Dex 在临床肾移植应用中,据一项随机临床试验研究,围术期静脉输注 Dex 24 h 可降低 DCD 肾移植术后 DGF 的发生率[35]。在另一项前瞻性、随机、对照、单盲研究中,术中及术后 2 h 接受 Dex 输注的肾移植受者术后肌酐水平降低,早期肾功能更好[36]。但也有研究报道,术中输注 Dex 对选择性活体供肾移植患者的肾功能或 DGF 没有任何有益影响[37]。

3.4 研究优势及局限性

本研究基于 DCD 供肾模型,通过改变保存液介质的技术扩展 DCD 供体的应用,扩大供体池。该策略操作简单易实施,易推广应用。但本研究未能验证 Dex 在体内实验肾移植中的保护作用,有待进一步研究;未深入探索 Dex 抑制细胞凋亡、炎症反应和氧化应激的具体分子机制。

3.5 研究意义

综上所述,Dex 可通过抑制细胞凋亡、氧化应激和炎症反应,减少肾组织损伤,实现对 DCD 供肾的保护作用。在不同浓度的 Dex 组中,以 100 nmol/L Dex 组和 1 000 nmol/L Dex 组展现出对 DCD 供体肾脏更好的保护效应。这对于拓展 DCD 供体器官的有效应用,扩大供体库,提高供体器官的保存质量和存活率具有重要的参考意义。

参考文献:

[1] ARZE AIMARETTI L, ARZE S. Preemptive renal transplantation—the best treatment option for terminal chronic renal failure[J]. Transplant Proc, 2016, 48(2): 609-611. DOI: 10.1016/j.transproceed.2016.02.047.

[2] LU T, YANG B, WANG R, *et al*. Xenotransplantation: current status in preclinical research[J]. Front Immunol, 2019, 10: 3060. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03060.

[3] OLIVA J. Therapeutic properties of mesenchymal stem cell on organ ischemia-reperfusion injury[J]. Int J Mol Sci, 2019,

20(21):5511. DOI:10.3390/ijms20215511.

[4] BANKER A, BHATT N, RAO P S, *et al*. A review of machine perfusion strategies in liver transplantation[J]. J Clin Exp Hepatol, 2023, 13(2):335-349. DOI:10.1016/j.jceh.2022.08.001.

[5] HOSGOOD S A, HOFF M, NICHOLSON M L. Treatment of transplant kidneys during machine perfusion[J]. Transpl Int, 2021, 34(2):224-232. DOI:10.1111/tri.13751.

[6] BAO N R, TANG B. Organ-protective effects and the underlying mechanism of dexmedetomidine[J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020:6136105. DOI:10.1155/2020/6136105.

[7] ROUFOSSE C, SIMMONDS N, CLAHSEN-VAN GRONINGEN M, *et al*. A 2018 reference guide to the Banff classification of renal allograft pathology[J]. Transplantation, 2018, 102(11):1795-1814. DOI:10.1097/TP.0000000000002366.

[8] JIA P, TENG J, ZOU J Z, *et al*. miR-21 contributes to xenon-conferred amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Anesthesiology, 2013, 119(3):621-630. DOI:10.1097/ALN.0b013e318298e5f1.

[9] VAN ZANDEN J E, JAGER N M, DAHA M R, *et al*. Complement therapeutics in the multi-organ donor:do or don't?[J]. Front Immunol, 2019, 10:329. DOI:10.3389/fimmu.2019.00329.

[10] LI X H, WEN L, LIU J, *et al*. Three-dimensional printing-driving liver therapies[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(33):6931-6953. DOI:10.2174/0929867328666210419124246.

[11] SMITH M, DOMINGUEZ-GIL B, GREER D M, *et al*. Organ donation after circulatory death:current status and future potential[J]. Intensive Care Med, 2019, 45(3):310-321. DOI:10.1007/s00134-019-05533-0.

[12] 中国医师协会器官移植医师分会,中华医学会外科学分会器官移植学组,中国肝移植注册中心科学委员会. 中国移植器官保护专家共识(2016版)[J]. 器官移植, 2016, 7(5):339-350. DOI:10.3969/j.issn.1674-7445.2016.05.003.
Organ Transplant Physicians of Chinese Medical Doctor Association, Organ Transplantation Group of Surgical Branch of Chinese Medical Association, Scientific Committee of China Liver Transplantation Registry. Chinese expert consensus on organ protection of transplantation (2016 edition)[J]. Organ Transplant, 2016, 7(5):339-350. DOI:10.3969/j.issn.1674-7445.2016.05.003.

[13] SAEB-PARSY K, MARTIN J L, SUMMERS D M, *et al*. Mitochondria as therapeutic targets in transplantation[J]. Trends Mol Med, 2021, 27(2):185-198. DOI:10.1016/j.molmed.2020.08.001.

[14] HAN W K, BAILLY V, ABICHANDANI R, *et al*. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1):a novel biomarker for human renal proximal tubule injury[J]. Kidney Int, 2002, 62(1):237-244. DOI:10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x.

[15] DE SILVA P M C S, MOHAMMED ABDUL K S, EAKANAYAKE E M D V, *et al*. Urinary biomarkers KIM-1 and NGAL for detection of chronic kidney disease of uncertain etiology (CKDu) among agricultural communities in Sri Lanka[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(9):e0004979. DOI:10.1371/journal.pntd.0004979.

[16] NIRALA N R, ASIKU J, DVIR H, *et al*. N-acetyl-β-d-glucosaminidase activity assay for monitoring insulin-dependent diabetes using Ag-porous Si SERS platform[J]. Talanta, 2022, 239:123087. DOI:10.1016/j.talanta.2021.123087.

[17] WU J, LI S T. Dexmedetomidine may produce extra protective effects on sepsis-induced diaphragm injury[J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(10):1407-1411. DOI:10.4103/0366-6999.156808.

[18] SUN M, WANG R, XIA R, *et al*. Amelioration of myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetes:a narrative review of the mechanisms and clinical applications of dexmedetomidine[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:949754. DOI:10.3389/fphar.2022.949754.

[19] TÜFEK A, TOKGÖZ O, ALIOSMANOGLU I, *et al*. The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. Int J Surg, 2013, 11(1):96-100. DOI:10.1016/j.ijsu.2012.12.003.

[20] LI J J, CHEN Q, HE X H, *et al*. Dexmedetomidine attenuates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury through α-2AR/PI3K/Akt pathway[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):1-11. DOI:10.1186/s12967-018-1455-1.

[21] KNIJFF L W D, VAN KOOTEN C, PLOEG R J. The effect of hypothermic machine perfusion to ameliorate ischemia-reperfusion injury in donor organs[J]. Front Immunol, 2022, 13:848352. DOI:10.3389/fimmu.2022.848352.

[22] OCHANDO J, ORDIKHANI F, BOROS P, *et al*. The innate immune response to allotransplants:mechanisms and therapeutic potentials[J]. Cell Mol Immunol, 2019, 16(4):350-356. DOI:10.1038/s41423-019-0216-2.

[23] 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.

[24] 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, 2020, 130(4): 1054-1062. DOI: 10.1213/ane.0000000000003820.

[25] SHEN W C, CHOU Y H, HUANG H P, *et al*. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells attenuate ischemic acute kidney injury and cardiac dysfunction[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 1-12. DOI: 10.1186/s13287-018-1092-x.

[26] GUAN T C, SONG J, WANG Y N, *et al*. Expression and characterization of recombinant bifunctional enzymes with glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 110: 188-195. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.005.

[27] 赵雪莹, 赵玺宣, 黄振龙, 等. 二至丸活性部位对D-半乳糖衰老模型大鼠SOD、MDA、MAO、LPF及衰老相关蛋白P16、P21影响的研究[J]. 中医药学报, 2023, 51(3): 35-40. DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.230053.
ZHAO X Y, ZHAO X X, HUANG Z L, *et al*. Effect of erzhi pill active parts on SOD, MDA, MAO, LPF and senescence related proteins of P16 and P21 in aging rats induced by D-galactoseon[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2023, 51(3): 35-40. DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.230053.

[28] CHEN Y P, FENG X J, HU X Y, *et al*. Dexmedetomidine ameliorates acute stress-induced kidney injury by attenuating oxidative stress and apoptosis through inhibition of the ROS/JNK signaling pathway[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2018, 2018: 1-12. DOI: 10.1155/2018/4035310.

[29] HENSHAW F R, DEWSBURY L S, LIM C K, *et al*. The effects of cannabinoids on pro- and anti-inflammatory cytokines: a systematic review of in vivo studies[J]. Cannabis Cannabinoid Res, 2021, 6(3): 177-195. DOI: 10.1089/can.2020.0105.

[30] YAO H, CHI X J, JIN Y, *et al*. Dexmedetomidine inhibits TLR4/NF-κB activation and reduces acute kidney injury after orthotopic autologous liver transplantation in rats[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 1-12. DOI: 10.1038/srep16849.

[31] DONG A L, ZHANG Y J, LU S J, *et al*. Influence of dexmedetomidine on myocardial injury in patients with simultaneous pancreas-kidney transplantation[J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2022, 2022: 1-8. DOI: 10.1155/2022/7196449.

[32] GU X Y, LIU B L, ZANG K K, *et al*. Dexmedetomidine inhibits Tetrodotoxin-resistant $Na_v1.8$ sodium channel activity through $G_{i/o}$-dependent pathway in rat dorsal root ganglion neurons[J]. Mol Brain, 2015, 8(1): 15. DOI: 10.1186/s13041-015-0105-2.

[33] RONG H, ZHAO Z B, FENG J Y, *et al*. The effects of dexmedetomidine pretreatment on the pro- and anti-inflammation systems after spinal cord injury in rats[J]. Brain Behav Immun, 2017, 64: 195-207. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.03.006.

[34] DONNAHOO K K, MELDRUM D R, SHENKAR R, *et al*. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFkappaB and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney[J]. J Urol, 2000, 163(4): 1328-1332. DOI: 10.1097/00005392-200004000-00079.

[35] SHAN X S, HU L K, WANG Y Q, *et al*. Effect of perioperative dexmedetomidine on delayed graft function following a donation-after-cardiac-death kidney transplant[J]. JAMA Netw Open, 2022, 5(6): e2215217. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.15217.

[36] WANG Y C, WANG M J, LEE C Y, *et al*. Effects of perioperative dexmedetomidine infusion on renal function and microcirculation in kidney transplant recipients: a randomised controlled trial[J]. Ann Med, 2022, 54(1): 1233-1243. DOI: 10.1080/07853890.2022.2067351.

[37] PARK J H, KOO B N, KIM M S, *et al*. Effects of intraoperative dexmedetomidine infusion on renal function in elective living donor kidney transplantation: a randomized controlled trial[J]. Can J Anesth, 2022, 69(4): 448-459. DOI: 10.1007/s12630-021-02173-1.

(收稿:2023-07-18;修回:2023-09-16)

(编辑 刘秋池)