doi:10.11659/jjssx.08E019103

·基础研究·

右美托咪定在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用及其机制研究

魏 勤[1],龙端阳[1],刘 宿[1],高 翔[2] (1.陆军军医大学特色医学中心大坪医院麻醉科,重庆 400042;2.重庆北部妇产医院麻醉科,重庆 401120)

[摘 要] **目的** 探讨右美托咪定(Dex)在大鼠肝缺血再灌注损伤(HIRI)中的作用及其机制。**方法** 选取 SD 大鼠 30 只,采用随机数字表法分为 HIRI 实验组(HIRI-Dex 组)、HIRI 模型组(HIRI-C 组)和假手术组(Sham 组),每组 10 只。前 2 组采用肝门部血流阻断法制备 HIRI 模型,Sham 组仅开腹显露肝门,随后关腹。HIRI-Dex 组于造模前 30 min 腹腔注射右美托咪定 50 μg/kg;HIRI-C组及 Sham 组给予等量生理盐水。于再灌注 6 h 后取各组大鼠血液和肝组织标本,采用 ELISA 检测血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及白介素-6(IL-6)水平;MDA、MPO 试剂盒检测肝组织 MDA 水平和 MPO 活性;血细胞自动分析仪测定各组外周血中性粒细胞(PMN)计数;Western blot 检测肝组织中 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白的表达水平。**结果** HIRI-C 组大鼠 AST、ALT 及 MDA 水平显著高于 Sham 组($P<0.01$);HIRI-Dex 组大鼠 AST、ALT、MDA、IL-6 水平、MPO 活性、PMN 计数、p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达均显著低于 HIRI-C 组($P<0.01$)。**结论** 右美托咪定可减轻大鼠肝缺血再灌注损伤;这种保护作用可能和抑制氧化应激和炎性反应有关,并通过抑制 JAK/STAT 通路激活而发挥作用。

[关键词] 右美托咪定;肝缺血再灌注损伤;JAK/STAT 通路;白介素-6;原发性肝肿瘤;肝功能;大鼠

[中图分类号] R969.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-08-20

Effect and mechanism of dexmedetomidine in rat hepatic ischemia-reperfusion injury

WEI Qin[1], LONG Duan-yang[1], LIU Su[1], GAO Xiang[2] (1. Department of Anesthesiology, Daping Hospital, Characteristic Medical Center of Army Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Anesthesiology, Chongqing Beibu Maternity Hospital, Chongqing 401120, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect and mechanism of dexmedetomidine (Dex) on hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI) in rats. **Methods** A total of thirty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups: HIRI experimental group (HIRI-Dex group), HIRI model group (HIRI-C group) and control group (Sham group). In the HIRI-Dex group and the HIRI-C group, the HIRI model was induced by hepatic portal interdicting. The rats in Sham group underwent a sham proceduce as switched the abdomen and revealed the hepatic portal. In the HIRI-Dex group, rats received Dex 50 μg/kg 30 minutes before establishing the model, while the same amount of saline was used for the HIRI-C group and Sham group. After 6 hours of reperfusion, blood and liver tissue samples from each group were taken to detect the following indicators. AST, ALT, and IL-6 levels were measured by ELISA; MDA and MPO tests were used to detect MDA level and MPO activity in liver tissues; the PMN count in peripheral blood of each group was measured by blood cell analyzer; the expression levels of p-JAK1 and p-STAT3 in liver were detected by Western blot. **Results** Compared with the Sham group, the levels of AST, ALT and MDA in HIRI-C group were significantly higher($P<0.01$). Compared with the HIRI-C group, the levels of AST, ALT, MDA, IL-6, MPO activity, PMN count, the expression of p-JAK1 and p-STAT3 in HIRI-Dex group were significantly lower($P<0.01$). **Conclusion** Dexmedetomidine can attenuate the HIRI of rats. Its protective effect may be related to the inhibition of oxidative stress and inflammatory responses, which may be activated by inhibiting the activation of the JAK/STAT pathway.

Keywords: dexmedetomidine; hepatic ischemia-reperfusion injury; JAK/STAT pathway; interleukin-6; primary hepatic tumor; hepatic function; rats

原发性肝肿瘤首选治疗方法是手术切除,肝缺血再灌注损伤(hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI)是肝肿瘤切除术围术期常见并发症,是肝移植术后肝功能衰竭的主要原因,严重影响患者预后[1]。HIRI 的机制尚未完全阐明,有研究认为炎性反应和氧化应激对其起着重要作用,主要涉及肝 Kupffer 细胞和中性粒细胞的激活、趋化因子和细胞因子的产生以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的释放等多种因素[2]。目前,临床仍缺乏预防和治疗 HIRI 的有效方法。右美托咪定(dexmedetomidin, Dex)是一种新型高选择性 α2 肾上腺素受体激动剂,由于其具有镇静、镇痛、催眠和

[基金项目] 国家自然科学基金(81701116)

[通信作者] 高 翔,E-mail:241872494@qq.com

阻滞交感神经等药理学作用,被广泛应用于临床麻醉[3-4]。同时,由于 Dex 具有调控基因表达、通道蛋白激活、细胞凋亡与坏死等多方面的能力,还表现出抗炎、抗氧化和对多种器官缺血再灌注损伤的保护作用[5]。既往研究表明,Dex 可能通过调控 ERK1/2 信号通路,在局部脑缺血再灌注损伤及心肌缺血再灌注损伤中发挥保护作用[6]。同时,有研究发现,在临床肝肿瘤切除术中应用 Dex 可有效降低患者血清天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)及总胆红素(total bilirubin,TBIL)等肝损伤指标,提示 Dex 具有肝保护效应[7]。但是,Dex 在肝缺血再灌注损伤中保护作用的机制尚不明确。本研究通过肝门阻断法建立大鼠 HIRI 模型,验证 Dex 在 HIRI 中的保护作用是否与抗炎、抗氧化应激有关,并进一步探讨 Dex 在 HIRI 中保护作用的具体分子机制,以期为 HIRI 的预防及改善预后提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器

清洁级成年 SD 大鼠 30 只,雌雄不分,体质量 220~250 g,购自原第三军医大学实验动物中心。右美托咪定(江苏恒瑞医药股份有限公司),AST 大鼠 ELISA 试剂盒(BioVision 公司,美国),ALT 大鼠 ELISA 试剂盒和髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)活性检测试剂盒(Abcam 公司,英国),IL-6 ELISA 试剂盒和丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),兔抗 p-JAK1 多克隆抗体(Novus 公司,美国)、小鼠抗 p-STAT3 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),兔抗 GAPDH 一抗、HRP 标记羊抗兔二抗、HRP 标记大鼠抗小鼠二抗(北京康为世纪生物科技有限公司),其余试剂均为国产分析纯。血细胞自动分析仪(桂林优利特集团有限公司),752 型紫外-可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司),iMark 酶标仪(BIO-RAD 公司,美国),Imager 凝胶成像分析系统(Alpha Innotech 公司,美国)。

1.2 实验分组及 HIRI 大鼠模型制备

30 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为 HIRI 实验组(HIRI-Dex 组)、HIRI 模型组(HIRI-C 组)和假手术组(Sham 组),每组 10 只。参考文献[8]采用肝门部血流阻断法建立 HIRI 模型。经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 0.1 mL/100 g 行全身麻醉,清洁条件下于剑突下经腹白线切开约 3 cm 的切口进腹,分离肝周血管和韧带,游离肝,显露肝门。以无损伤血管夹阻断肝门 30 min,随后松开血管夹,恢复血流和肝灌注,模拟大鼠肝的缺血后再灌注,然后分层关腹。Sham 组大鼠仅开腹并显露肝门,不进行肝门阻断,其他手术过程同 HIRI 组,随后关腹。HIRI-Dex 组于造模前 30 min 腹腔注射右美托咪定等效剂量50 μg/kg;HIRI-C 组及 Sham 组给予等量生理盐水。于再灌注 6 h 后取各组大鼠下腔静脉及尾静脉血液和肝组织标本,进行后续实验。

1.3 检测指标

于再灌注 6 h 后,取各组相应时相点血液及肝组织标本。分别采用 AST、ALT 及白介素-6(interleukin 6,IL-6)相关 ELISA 试剂盒检测下腔静脉血中 AST、ALT 及 IL-6 水平;采用 MDA 检测试剂盒检测肝组织匀浆中 MDA 水平;采用 MPO 活性检测试剂盒检测肝组织匀浆中 MPO 活性;应用血细胞自动分析仪进行外周血中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil,PMN)计数。

1.4 Western blot 检测蛋白的表达

于再灌注 6 h 后,取各组相应时相点肝组织,加入蛋白裂解液(改进 RIPA 裂解液)、蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂,冰上裂解,12 000 g 离心 15 min,取上清并测定其浓度。取总蛋白 40 μg 行 SDS-PAGE 电泳,随后将蛋白电转印(恒流 200 mA,电压上限70 V,转膜时间 50 min)至 PVDF 膜,将 PVDF 膜浸入含 5% 脱脂奶粉的溶液中封闭 2 h,分别加入 1∶1 000 兔抗 p-JAK1多克隆抗体、1∶1 000 小鼠抗 p-STAT3 单克隆抗体、1∶2 000 稀释的兔抗 GAPDH 一抗,4 ℃孵育过夜,TBS 洗膜 3 次;随后加入 1∶2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗及 HRP 标记的大鼠抗小鼠二抗,室温孵育 2 h,TBS 洗膜 3 次,DAB 显色,采用 Imager 凝胶成像分析系统进行灰度扫描,对各条带灰度值进行半定量分析,以各组蛋白的灰度值与 GAPDH 灰度值的比值反映其表达水平。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠下腔静脉血中 AST 和 ALT 水平

大鼠肝再灌注 6 h 后,HIRI-C 组大鼠 AST 和 ALT 水平显著高于 Sham 组,差异具有极显著性统计学意

义($P<0.01$);HIRI-Dex 组大鼠 AST 和 ALT 水平显著低于 HIRI-C 组,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见表 1。

表 1 3 组大鼠血清 AST 和 ALT 水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)
Sham 组	40 234 ±41.45	106.20 ±6.16
HIRI-Dex 组	552.71 ±35.95#	134.93 ±19.01#
HIRI-C 组	1 237.77 ±59.29*	298.42 ±38.07*

*:与 Sham 组比较,$P<0.01$;#:与 HIRI-C 组比较,$P<0.01$

2.2 大鼠肝组织 MDA 水平和 MPO 活性、下腔静脉血中 IL-6 水平及外周血 PMN 计数

HIRI-C 组大鼠肝组织 MDA 水平和 MPO 活性、下腔静脉血中 IL-6 水平及外周血 PMN 计数均显著高于 Sham 组,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$)。HIRI-Dex 组大鼠肝组织 MDA 水平和 MPO 活性、下腔静脉血中 IL-6 水平及外周血 PMN 计数均显著低于 HIRI-C 组,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见表 2。

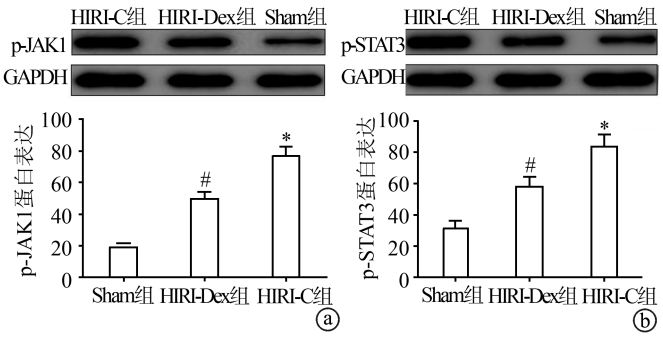
表 2 3 组大鼠肝组织 MDA 水平和 MPO 活性、下腔静脉血中 IL-6 水平及外周血 PMN 计数比较($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

组别	MDA (nmol/mgprot)	MPO (U/g)	IL-6 (pg/mL)	PMN ($\times10^9$/L)
Sham 组	0.72 ±0.12	5.25 ±0.46	46.28 ±4.79	4.27 ±0.45
HIRI-Dex 组	1.10 ±0.19#	9.94 ±0.56#	56.85 ±4.51#	6.06 ±0.34#
HIRI-C 组	2.53 ±0.13*	37.90 ±1.55*	102.16 ±5.26*	8.17 ±0.40*

*:与 Sham 组比较,$P<0.01$;#:与 HIRI-C 组比较,$P<0.01$

2.3 蛋白表达情况

HIRI-C 组大鼠 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达均显著高于 Sham 组,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$)。HIRI-Dex 组大鼠 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达均显著低于 HIRI-C 组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



a:p-JAK1 蛋白表达;b:p-STAT3 蛋白表达 *:与 Sham 组比较,$P<0.01$;#:与 HIRI-C 组比较,$P<0.05$

图 1 3 组大鼠肝组织 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达情况

3 讨论

手术切除是目前治疗原发性肝肿瘤的首选方法和最有效措施。既往研究表明,术中大量出血是造成术后病死率和并发症发生率增高以及术后生存率降低的重要独立因素[9]。由于外科微创技术的发展,目前主要应用肝门阻断法控制出血。同时,由于肝移植手术本身对肝血流的影响,继发于肝切除和肝移植的 HIRI 是围术期常见问题,易导致术后肝功能衰竭和预后不良。HIRI 主要是通过 Kupffer 细胞释放炎性细胞因子、氧化应激和钙离子超载等引起,其中炎性反应和氧化应激在 HIRI 过程中起重要作用。Dex 是一种新型高选择性 α2 肾上腺素受体激动剂,其药理作用包括镇静、镇痛、催眠和抗交感反射等。同时,其通过抗炎、抗氧化应激等方式发挥器官保护作用,减轻多种器官的缺血再灌注损伤[10]。本研究采用肝门阻断 30 min、再灌注 6 h 的方法建立 HIRI 大鼠模型,检测下腔静脉血中 AST 和 ALT 水平。血清中 AST 和 ALT 的水平是反映肝细胞损伤最敏感的指标。本研究结果显示,HIRI-C 组 AST 和 ALT 水平明显升高,提示 HIRI 大鼠肝细胞损伤严重,HIRI 大鼠模型构建成功。HIRI-Dex 组大鼠 AST 和 ALT 水平显著低于 HIRI-C 组,提示应用 Dex 可以对抗 HIRI 的肝细胞损伤作用。

既往研究报道,Dex 可以减少循环中过氧化指标 MDA,通过抗氧化应激在上肢缺血再灌注损伤中起保护作用[11]。MPO 由 PMN 合成和分泌,MPO 的含量和活性可以有效反映 PMN 的功能和活性程度。在肺组织发生缺血再灌注损伤时,PMN 可以引起氧化应激反应和炎性反应。PMN 可以诱导 MPO 产生和分泌有害氧自由基,这些氧自由基的生成是 HIRI 的重要原因之一,有效清除氧自由基可以明显减轻 HIRI[12]。IL-6 是由 T 细胞和巨噬细胞分泌的促炎细胞因子,在炎症、创伤及肿瘤等多种急慢性反应中表达上升[13-14]。本研究结果显示,HIRI-C 组大鼠肝组织 MDA 水平和 MPO 活性、下腔静脉血中 IL-6 水平及外周血 PMN 计数均显著升高,提示在大鼠 HIRI 动物模型中,存在明显的氧化应激反应和炎性反应。同时,HIRI-Dex 组以上指标均明显低于 HIRI-C 组,验证了 Dex 可以通过抑制氧化应激及抗炎效应在大鼠 HIRI 中发挥保护作用。

JAK/STAT 信号通路是细胞因子信号转导的重要途径之一,在缺血再灌注损伤的病理生理过程中,JAK/STAT 信号通路可能发挥重要调控作用。研究发现,JAK/STAT 信号通路的激活可以减轻脑缺血再灌注模型中的氧化应激反应[15]。另有研究报道,抑制 JAK/STAT 信号通路可以减轻肾缺血再灌注损伤中的肾小管细胞凋亡[16]。研究发现,蛛网膜下腔出血后早期脑损伤可能与 JAK/STAT 通路激活有关[17]。也有

研究报道,黄角颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用可能与抑制 JAK/STAT 通路有关[18]。而在心肌缺血再灌注损伤中,抑制 JAK/STAT 通路可以下调 NF-κB活性并对心肌起保护作用[19]。抑制 JAK/STAT 通路还可以有效抑制巨噬细胞的激活[20]。本研究结果显示,HIRI 可以明显激活 JAK/STAT 通路,而通过 Dex 处理后,可明显降低 p-JAK 和 p-STAT 的表达,有效抑制 JAK/STAT 通路的激活,提示 Dex 的保护作用可能与抑制 JAK/STAT 通路有关,这一作用可以充分抑制炎性反应,并且不影响 JAK/STAT 通路的抗氧化应激效应。

综上所述,右美托咪定可减轻大鼠肝缺血再灌注损伤,其保护作用可能与抑制氧化应激和炎性反应有关,通过抑制 JAK/STAT 通路激活而发挥作用。

[参考文献]

[1] Ibacache M, Sanchez G, Pedrozo Z, et al. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(4):537 - 545. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.12.013.

[2] Katwal G, Baral D, Fan X, et al. SIRT3 a major player in attenuation of hepatic ischemia-reperfusion injury by reducing ROS via its downstream mediators: SOD2, CYP-D, and HIF-1α[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 13:2976957. doi: 10.1155/2018/2976957.

[3] Dong X, Xing Q, Li Y, et al. Dexmedetomidine protects against ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle[J]. J Surg Res, 2014, 186(1): 240 - 245. doi:10.1016/j.jss.2013.07.052.

[4] Qin Z, Xiang C, Li H, et al. The impact of dexmedetomidine added to ropivicaine for transversus abdominis plane block on stress response in laparoscopic surgery: a randomized controlled trial[J]. BMC Anesthesiol, 2019, 19(1):181. doi:10.1186/s12871 - 019 - 0859 - 7.

[5] Li J, Dou X, Li D, et al. Dexmedetomidine ameliorates post-CPB lung injury in rats by activating the PI3K/Akt pathway[J]. J Invest Surg, 2019, 26:1 - 8. doi:10.1080/08941939.2018.1529839.

[6] Yu Q, Wu L, Liu T, et al. Protective effects of levo-tetrahydropalmatine on hepatic ischemia/reperfusion injury are mediated by inhibition of the ERK/NF-κB pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 8(70):435 - 445. doi:10.1016/j.intimp.2019.02.024.

[7] 陈贵珍,鲁开智,文欣荣. 右美托咪定在肝脏肿瘤切除患者肝脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. 重庆医学,2016,45(31):4420 - 4422. doi:10.3969/j.issn.1671 - 8348.2016.31.035.

[8] Akateh C, Beal EW, Kim JL, et al. Intrahepatic delivery of pegylated catalase is protective in a rat Ischemia/reperfusion injury model[J]. J Surg Res, 2019, 13(238):152 - 163. doi: 10.1016/j.jss.2019.01.028.

[9] Helling TS, Blondeau B, Wittek BJ. Perioperative factors and outcome associated with massive blood loss during major liver resections[J]. HPB (Oxford), 2004, 6(3): 181 - 185. doi: 10.1080/13651820410030826.

[10] Li WX, Luo RY, Chen C, et al. Effects of propofol, dexmedetomidine, and midazolam on postoperative cognitive dysfunction in elderly patients: a randomized controlled preliminary trial[J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132(4): 437 - 445. doi: 10.1097/CM9.0000000000000098.

[11] Yagmurdur H, Ozcan N, Dokumaci F, et al. Dexmedetomidine reduces the ischemia-reperfusion injury markers during upper extremity surgery with tourniquet[J]. J Hand Surg Am, 2008, 33(6):941 - 947. doi: 10.1016/j.jhsa.2008.01.014.

[12] Lee SH, Kim N, Lee CY, et al. Effects of dexmedetomidine on oxygenation and lung mechanics in patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease undergoing lung cancer surgery: a randomised double-blinded trial[J]. Eur J Anaesthesiol, 2016, 33(4):275 - 282. doi: 10.1097/EJA.0000000000000405.

[13] Alvarez P, Bogen O, Levine JD. Interleukin 6 decreases nociceptor expression of the potassium channel KV1.4 in a rat model of hand-arm vibration syndrome[J]. Pain, 2019, 160(8):1876 - 1882. doi:10.1097/j.pain.0000000000001570.

[14] Li Y, Liu LH, Yu XQ, et al. Transglycosylation improved caffeic acid phenethyl ester anti-inflammatory activity and water solubility by leuconostoc mesenteroides dextransucrase[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(16):4505 - 4512. doi: 10.1021/acs.jafc.9b01143.

[15] Buendia I, Gómez-Rangel V, González-Lafuente L, et al. Neuroprotective mechanism of the novel melatonin derivative Neu-P11 in brain ischemia related models[J]. Neuropharmacology, 2015, 99:187 - 195. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.07.014.

[16] Si Y, Bao H, Han L, et al. Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the JAK/STAT signaling activation[J]. J Transl Med, 2013, 9(11):141. doi:10.1186/1479 - 5876 - 11 - 141.

[17] 庞金伟,陈义天,杨 萍,等. JAK2/STAT3 信号通路在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用[J]. 重庆医学,2018,47(29):3730 - 3734. doi:10.3969/j.issn.1671 - 8348.2018.29.002.

[18] 潘宋斌, 万 琳, 邵 卫, 等. 黄角颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(9):1715 - 1719. doi:10.3969/j.issn.1000 - 4718.2018.09.030.

[19] 袁 泉,夏中元,赵 博,等. NF-κB 在 Jak2/STAT3 通路增加大鼠心肌缺血再灌注致脑损伤中的作用[J]. 医学研究杂志,2018, 47(7):55 - 58. doi:10.11969/j.issn.1673 - 548X.2018.07.013.

[20] 蔡建月,邵云侠,王 坤,等. 芍药苷通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制高糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞激活[J]. 中国药理学通报, 2019,35(1):56 - 62. doi:10.3969/j.issn.1001 - 1978.2019.01.013.

(编辑:左艳芳)