doi:10.11659/jjssx.02E024074

·基础研究·

右美托咪定对大鼠热/冷缺血后供肾的保护作用及机制研究

邹基凤,盛 浩,肖 亚,宋亚军 (陆军军医大学附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探索右美托咪定(Dex)对大鼠热缺血、冷缺血后供肾的保护作用及其潜在机制。**方法** 将21只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组(0 μmol/L Dex组)和Dex组(1 μmol/L Dex组),每组7只。采用放血法处死大鼠,热缺血30 min后摘取肾,对照组供肾直接固定或-80 ℃保存,模型组和Dex组供肾分别置于含0 μmol/L Dex和1 μmol/L Dex的威斯康星大学器官保存液中4 ℃冷藏24 h,模拟供肾冷缺血状态。肾组织行HE染色后观察形态学变化并进行组织损伤评分,比色法测定N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)活力,TUNEL法检测细胞凋亡情况,Western blot检测受体相互作用蛋白激酶3(RIPK3)蛋白表达水平,免疫荧光法测定磷酸化混合谱系激酶结构域样假激酶(pMLKL)表达水平。**结果** 对照组肾小球、肾小管无明显异常,模型组部分肾小管扩张,肾小管上皮细胞扁平,Dex组肾小管损伤较模型组缓解。与对照组比较,模型组和Dex组肾损伤评分、NAG活性升高,TUNEL阳性凋亡细胞数增多,pMLKL和RIPK3表达水平增加($P<0.05$)。与模型组比较,Dex组肾损伤评分、NAG活性降低,TUNEL阳性凋亡细胞数减少,pMLKL表达水平下降($P<0.05$)。**结论** Dex对大鼠热缺血、冷缺血后供肾具有保护作用,其机制与减少细胞凋亡、抑制坏死性凋亡有关。

[关键词] 热缺血;冷缺血;右美托咪定;肾移植;器官保护
[中图分类号] R322.61;R617;R971.3 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-02-29

Protective effects and mechanisms of dexmedetomidine on kidney donors after warm/cold ischemia in rats

ZOU Ji-feng, SHENG Hao, XIAO Ya, SONG Ya-jun (Department of Urology, Xinqiao Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects and mechanisms of dexmedetomidine (Dex) on kidney donors after warm ischemia and cold ischemia in rats. **Methods** A total of twenty-one male SD rats were randomly allocated into the control group, the model group (0 μmol/L Dex group) and the Dex group (1 μmol/L Dex group), with 7 rats in each group. All the rats were killed by bloodletting, the kidneys were extracted after 30 minutes of warm ischemia, and the kidneys of the control group were directly fixed or preserved at -80 ℃. The kidney donors of the model group and the Dex group were respectively refrigerated in the university of Wisconsin organ preservation solution containing 0 μmol/L Dex and 1 μmol/L Dex at 4 ℃ for 24 hours, to simulate the cold ischemia state of the kidney donors. HE staining was performed to observe the morphological changes and the tissue injury score was conducted. The activity of N-acetyl-β-D-glucosaminase (NAG) was determined by colorimetry, the apoptosis level was detected by TUNEL, the expression level of receptor-interacting protein kinase 3(RIPK3) was detected by Western blot, and the expression level of phosphorylation mixed lineage kinase domain like protein (pMLKL) was determined by immunofluorescence method. **Results** In the control group, there were no obvious abnormalities in glomerular or renal tubules. In the model group, some renal tubules were dilated and tubular epithelial cells were flattened. Compared with the model group, the damage of renal tubules in the Dex group was alleviated. Compared with the control group, kidney injury score, NAG activity, TUNEL positive cell number, pMLKL and RIPK3 expression levels were increased in the model group and the Dex group ($P<0.05$). Compared with the model group, kidney injury score, NAG activity, TUNEL positive cell number, and pMLKL expression level were decreased in the Dex group ($P<0.05$). **Conclusion** Dex has protective effects on kidney donors after warm ischemia and cold ischemia, and its mechanism is related to reducing apoptosis and inhibiting necroptosis.

Keywords: warm ischemia;cold ischemia;dexmedetomidine;kidney transplantation;organ protection

肾移植是终末期肾病患者的最佳治疗方法,可降低病死率,并提高患者生活质量[1]。然而,供肾从摘取到移植过程中不可避免地会出现热缺血和冷缺血损伤。因此,任何减轻热缺血、冷缺血损伤的保护策略都有助于提高供肾的保存质量,有利于改善肾移植患者预后。右美托咪定(dexmedetomidine,Dex)是一种高选择性α_2肾上腺素能受体(α_2 adrenergic receptor,α_2AR)激动剂,不仅具有镇静和抗焦虑作用,还具有抗炎和抗凋亡等特性,对多个器官(如心、脑、肾、肺等)具有显著的保护效果[2]。目前调控性死亡方式(如凋亡、坏死性凋亡、铁死亡等)在肾移植领域的研究较多[3],有研究报道Dex可抑制凋亡和受体相互作用蛋白激酶(receptor-interacting protein kinase, RIPK)介导的坏死性凋亡,提高肺移植物的保存形态和质量[4],但Dex是否可以通过调控RIPK1/RIPK3/磷酸化混合谱系

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0611);重庆市博士"直通车"科研项目(CSTB2022BSXM-JCX0007)
[通信作者] 宋亚军,E-mail:332878249@qq.com

激酶结构域样假激酶(phosphorylation mixed lineage kinase domain like protein, pMLKL)信号通路改善热缺血、冷缺血后供肾损伤尚不清楚。据此,本研究探讨Dex对大鼠经热缺血、冷缺血后供肾损伤的作用,并进一步探索Dex缓解供肾损伤的潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

21只SPF级雄性SD大鼠,由陆军军医大学提供[动物生产许可证号:SCXK(渝)2022-0011;动物使用许可证号:SYXK(渝)2022-0018],6~7周龄,体质量150~200 g。本实验获得陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(批准号:AMUWEC20232978),且遵循3R原则。

1.2 主要药物与试剂

右美托咪定购自美国sigma公司;TUNEL检测试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司;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;pMLKL一抗购自美国Affinity Biosciences公司;受体相互作用蛋白激酶3(receptor-interacting protein kinase 3, IPK3)一抗购自美国Santa Cruz公司;威斯康星大学器官保存液(UW液)购自美国器官修复医疗科技股份有限公司;DAPI荧光染料和RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL底物购自美国Thermofisher公司。

1.3 主要仪器

正置荧光显微镜购自德国ZEISS公司;高速冷冻离心机购自Eppendorf(上海)有限公司;移液器购自北京大龙兴创实验仪器公司。

1.4 方法

1.4.1 实验分组和动物模型 21只SPF级雄性SD大鼠被随机分为3组(n=7):对照组、模型组(0 μmol/L Dex组)和Dex组(1 μmol/L Dex组)。采用1%苯巴比妥钠(0.8~1.0 mL)对空腹大鼠行腹腔注射,大鼠镇静后股静脉注射肝素(250 IU/mL),然后采用放血法处死大鼠,从呼吸心跳停止时开始记录热缺血时间。待热缺血30 min时开始灌注肾:对照组大鼠用生理盐水灌注;模型组用不含Dex的UW液灌注,Dex组用含1 μmol/L Dex的UW液灌注,3组灌注液体积均为4 mL。对照组大鼠摘取的肾一侧直接用4%多聚甲醛固定,另一侧置于-80 ℃冰箱保存。模型组和Dex组大鼠的肾分别置于不含Dex和含1 μmol/L Dex的UW液中4 ℃保存24 h模拟供肾冷缺血状态。取出冷藏后的肾,一侧直接固定,后续用于石蜡切片、TUNEL检测和免疫荧光染色;另一侧置于-80 ℃保存,后续用于NAG活性检测和Western blot。

1.4.2 HE染色 取肾组织制作4 μm的石蜡组织切片,行HE染色,显微镜下观察肾组织形态学改变。根据肾小管损伤的程度进行半定量评分[5-6]:肾小管无损伤,记0分;肾小管损伤面积≤25%为轻度损伤,记1分;肾小管损伤面积26%~50%为中度损伤,记2分;肾小管损伤面积51%~75%为重度损伤,记3分;肾小管损伤面积>75%为极重度损伤,记4分。

1.4.3 NAG活性测定 从-80 ℃冰箱中取出肾组织,于冰上研磨,制备匀浆液(浓度约10%),冷冻离心机离心10 min,再取上清液待用,根据试剂盒说明书步骤操作,采用比色法测定NAG活性。

1.4.4 TUNEL法检测细胞凋亡情况 石蜡切片经脱蜡至水后PBS清洗5 min,按照TUNEL试剂盒说明书,石蜡切片脱蜡固定,蛋白酶K透膜10 min,再经PBS冲洗,使用10%山羊血清封闭30 min;随后使用平衡缓冲液孵育10 min,加入按照说明书制备的TdT反应混合物,37 ℃孵育1 h,使用DAPI室温孵育30 min,对凋亡细胞核进行染色;随后封片,在荧光显微镜下进行观察拍照,计数阳性细胞。

1.4.5 蛋白提取及免疫印迹检测 每组样品称取20 mg,研钵里加液氮研磨,冰上使用RIPA裂解液裂解肾组织获得总蛋白。用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定各组样本组织蛋白浓度,根据测定的蛋白浓度,将每组样品蛋白浓度调整一致。选取合适浓度的SDS-PAGE凝胶进行电泳,随后将蛋白电转至PVDF膜,再用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭2 h。加入一抗RIPK3(1∶1 000)和GAPDH(1∶10 000)于4 ℃冰箱孵育过夜,次日室温孵育二抗(1∶5 000)1 h。然后进行显影,并使用Image J软件进行定量分析。以内参蛋白GAPDH为基准,计算各组样本目的蛋白表达量。

1.4.6 免疫荧光染色 将石蜡切片脱蜡后,用柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复。然后使用山羊血清封闭1 h,加入一抗pMLKL(1∶200),于4 ℃孵育过夜。经PBS洗涤,荧光二抗避光孵育1 h,使用DAPI对细胞核进行染色。在荧光显微镜下观察和拍照,使用Image J软件进行量化分析。

1.5 统计学分析

本研究数据采用Graph Pad Prism 8.0软件进行统计分析并作图,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析(*ANOVA*)和*Tukey's*多重比较检验。P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Dex改善热缺血、冷缺血后供肾组织损伤

HE染色结果显示,对照组肾小管、肾小球形态与结构保存较好,细胞核染色呈蓝色,细胞质染色呈红

色,未见肾小管扩张;模型组和Dex组可见部分近端肾小管管腔扩张,肾小管上皮细胞呈圆形或者扁平状,可见部分刷状缘脱落,部分腔内偶见从基底膜脱落的上皮细胞,部分核染色消失;Dex组较模型组肾小管扩张的程度及总面积减少(图1)。对照组、模型组和Dex组肾损伤评分分别为(0.58±0.19)分、(2.15±0.31)分和(1.35±0.18)分,与对照组比较,模型组和Dex组肾组织损伤评分显著增加(P<0.05);与模型组比较,Dex组肾组织损伤评分降低(P<0.05)。

2.2 Dex降低热缺血、冷缺血后供肾组织NAG活性

比色法测定各组肾组织NAG活力显示,对照组、模型组和Dex组NAG活性分别为(93.43±2.13)U/g、(113.50±1.94)U/g、(104.30±2.12)U/g。模型组和Dex组的NAG活性水平较对照组增加(P<0.05);Dex组NAG活性水平较模型组显著降低(P<0.05)。由此表明,经冷缺血处理后的肾组织损伤加重,而经Dex处理后肾组织损伤有所缓解。

2.3 Dex减少热缺血、冷缺血后供肾组织细胞凋亡

TUNEL法检测显示,模型组和Dex组阳性凋亡细胞数较对照组显著增加(P<0.05);Dex组阳性凋亡细胞数较模型组减少(P<0.05),见图2。

2.4 Dex改善热缺血、冷缺血后供肾组织细胞坏死性凋亡

免疫荧光染色显示,模型组和Dex组的pMLKL蛋白表达水平较对照组显著上调(P<0.05);Dex组pMLKL蛋白表达水平较模型组显著下调(P<0.05),见图3。蛋白免疫印迹分析显示,模型组和Dex组的RIPK3蛋白表达较对照组显著上调(P<0.05);Dex组RIPK3蛋白表达水平与模型组比较差异无统计学意义(P>0.05),见图4。

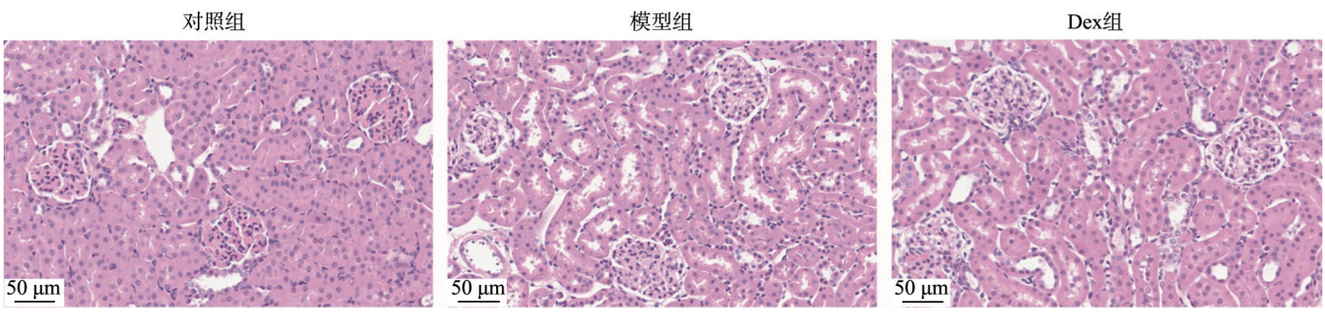
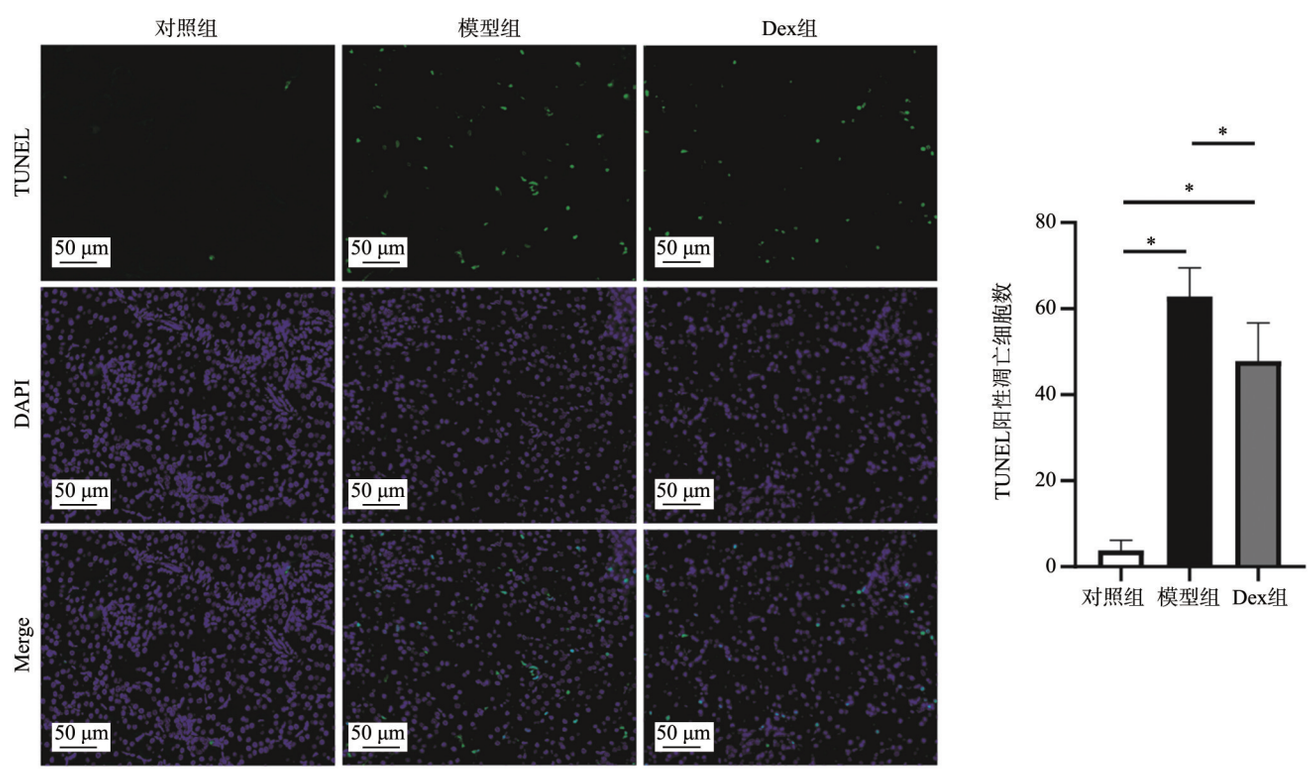
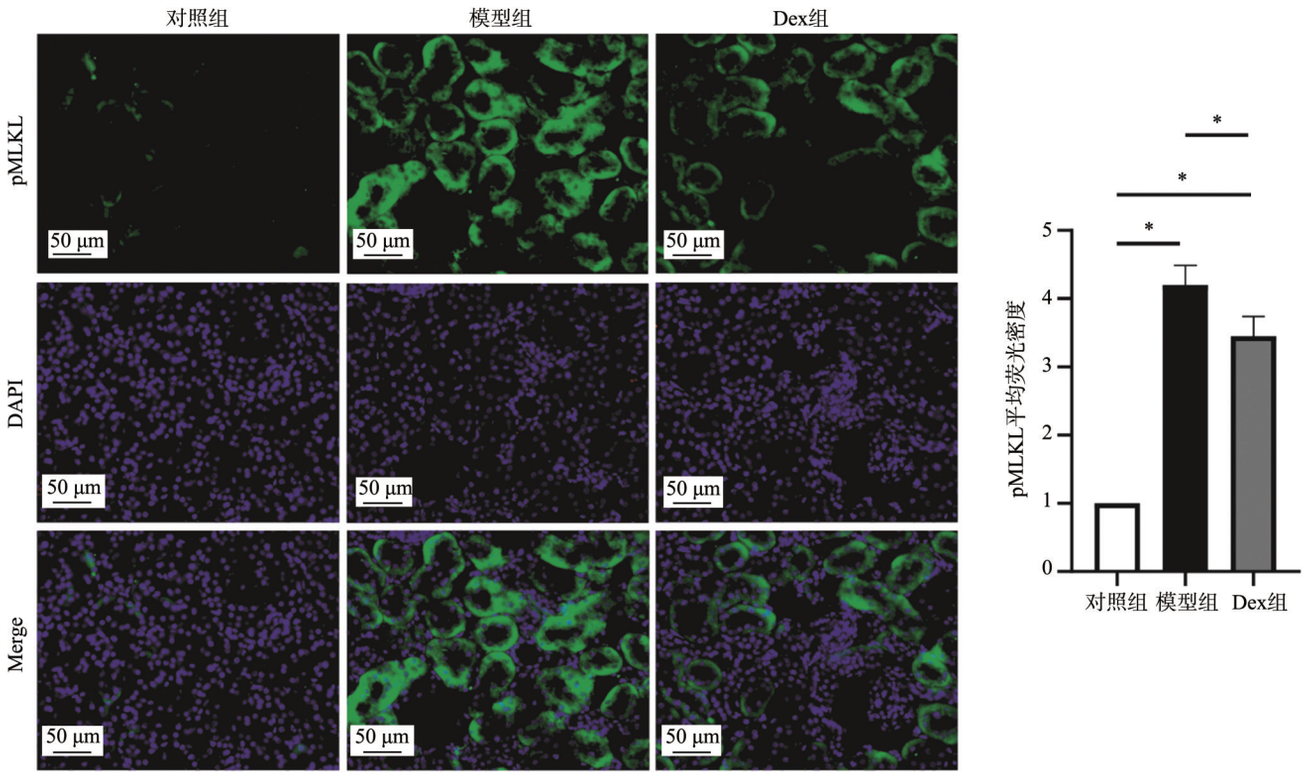


图1 各组肾组织HE染色结果



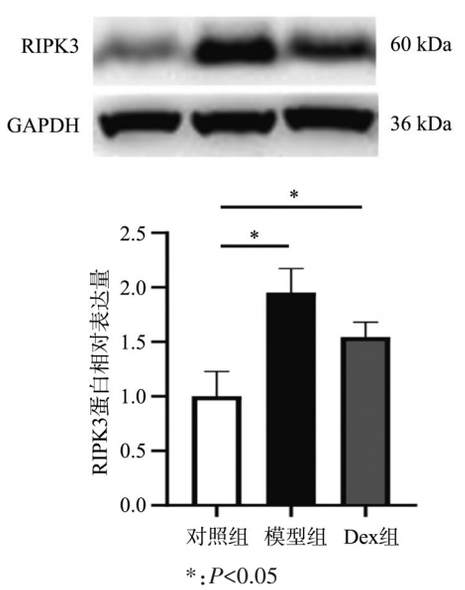
绿色荧光:凋亡细胞;蓝色荧光:细胞核 *:P<0.05

图2 各组肾组织细胞凋亡水平



绿色荧光:pMLKL;蓝色荧光:细胞核 *:$P<0.05$

图3 免疫荧光检测各组pMLKL蛋白表达水平



*:$P<0.05$

图4 Western blot检测各组RIPK3蛋白表达水平

3 讨论

本研究建立大鼠供肾摘取过程中必经的热缺血、冷缺血损伤模型,待大鼠心跳呼吸停止后热缺血30 min摘取肾,并将其置于4 ℃保存液冷缺血24 h,模拟供肾热缺血、冷缺血损伤过程。在供肾摘取过程中,低血压导致的全身血流动力学紊乱以及缺氧后的代谢异常可能引起热缺血期间的细胞损伤;此外,在供肾冷保存期间细胞代谢虽然减缓,但仍然持续消耗腺嘌呤核苷三磷酸,用于维持基本的细胞功能,冷缺血期间可进一步加重热缺血引起的肾损伤[7]。

HE染色是观察肾病理学变化的常规染色方式,可观察肾小管、肾小球形态学结构变化,并能进行组织损伤评分。NAG是一种细胞内溶酶体糖苷酶,组织损伤时NAG的快速升高使其成为临床各种病理状况早期诊断和严重程度评估的敏感标志物[8]。因此,本研究选择HE染色和NAG活力检测来评估肾损伤,结果显示,模型组和Dex组经热缺血、冷缺血后大鼠供肾较对照组出现了不同程度的损伤,可见部分肾小管管腔扩张,部分腔内可见从基底膜脱落的上皮细胞,肾小管上皮细胞刷状缘扁平或脱落等,并且NAG活性水平升高。这说明供肾在冷缺血24 h后损伤加重。

器官移植过程中不可避免地会发生缺血再灌注损伤,其可能会导致严重的急性肾损伤,增加患者移植不良结局发生率和病死率[9-10]。而肾缺血再灌注损伤的核心特征是坏死和凋亡导致的肾小管细胞死亡。细胞死亡的方式包括细胞凋亡、坏死性凋亡、铁死亡、焦亡和坏死等,这些细胞死亡方式已经成为了各种肾疾病发生的核心事件[11]。据此,本研究选择了细胞凋亡和坏死性凋亡这两种细胞死亡方式进行探讨验证。

Dex作为α_2AR激动剂,具有镇静镇痛作用,广泛应用于临床麻醉与ICU镇静[12-13]。Dex的肾保护作用主要包括抗交感神经作用、减少炎症反应和氧化应

激、减少细胞凋亡、增加自噬、减少铁死亡等[14]。据报道,Dex通过抗凋亡减轻缺血再灌注损伤,对细胞具有保护作用[15-16]。Dex可抑制线粒体损伤和细胞凋亡,从而防止肾缺血再灌注损伤[17]。Dex可抑制细胞凋亡,并减少炎症细胞因子的产生[18]。Dex可通过抑制细胞凋亡减轻肝缺血再灌注后诱发的大鼠肾损伤[19]。据此,本研究选择细胞凋亡的关键信号分子进行检测,验证Dex对热缺血、冷缺血后供肾的保护作用。细胞凋亡会清除不需要或受损的细胞,当有应激源或缺乏细胞存活信号时会激活半胱天冬酶3级联反应并介导细胞凋亡,募集巨噬细胞吞噬降解死亡细胞[20]。

细胞凋亡具有特定的形态学特征,可通过组织学评估。然而,在光学显微镜下观察组织切片中的凋亡细胞具有较强的主观性,对改变不典型的凋亡细胞判断较困难。因此,易于量化的TUNEL检测更适用于细胞凋亡的判断。本研究结果显示,与模型组比较,Dex组TUNEL阳性凋亡细胞数减少,表明Dex对热缺血、冷缺血后供肾提供保护作用可能与抑制细胞凋亡有关。

坏死性凋亡现已被确定为程序性细胞死亡的重要途径,其由多种细胞因子或模式识别受体引发,并以RIPK1和RIPK3依赖性方式调节。RIPK1、RIPK3及其底物MLKL是执行坏死性凋亡的关键蛋白[21]。RIPK1和RIPK3相互作用形成坏死体复合物,导致MLKL通过磷酸化级联反应激活,pMLKL发生寡聚化并迁移到质膜,通过启动膜破裂或调节离子通量诱导坏死性凋亡[21-22]。坏死性凋亡的细胞表现出坏死表型,包括肿胀和膜破裂,并释放损伤相关分子模式、炎症细胞因子和趋化因子,从而介导炎症反应。坏死性凋亡被认为在多种肾损伤模型中起作用,包括器官移植后诱发的缺血再灌注损伤,且坏死性凋亡和铁死亡是肾脏中研究最广泛的调控性坏死形式[3]。研究证实,心脏死亡后供体长时间的热缺血会引发RIPK介导的坏死性凋亡,随后的冷缺血则会使供体损伤加剧,补充Dex可减少RIPK3和pMLKL等蛋白的表达,抑制坏死性凋亡,从而显著改善肺移植物形态,提高保存质量[4]。据此,本研究在探索Dex对热缺血、冷缺血后供肾提供保护作用的机制中选择坏死性凋亡的关键信号分子进行检测,结果显示,Dex组RIPK3蛋白表达水平与模型组比较无统计学差异,然而模型组和Dex组的pMLKL蛋白表达水平较对照组显著上调,Dex组pMLKL蛋白表达水平较模型组显著下调,这说明Dex对热缺血、冷缺血后供肾提供保护作用与抑制细胞坏死性凋亡有关。

本研究构建经热缺血、冷缺血的供肾模型,通过添加Dex提高供肾缺血期间的保存质量。但由于手术操作技术受限,Dex在活体肾移植后再灌注阶段的保护作用未能进行验证,值得进一步探索。

综上所述,Dex对热缺血、冷缺血后的供肾具有保护作用,可减轻肾组织损伤,提供更好的形态学组织结构保护,该作用与抑制细胞凋亡和坏死性凋亡有关。在热缺血、冷缺血期间保持供体器官功能的能力对于成功移植至关重要,为此,在供体体外储存期间应尽量减少缺血性损伤,在获取和植入期间也应如此。Dex有望成为供体器官(尤其是供肾,但不限于供肾)缺血期间保存的新策略,但其具体作用机制尚未完全阐明,仍需深入研究。

[参考文献]

[1] Voora S, Adey DB. Management of kidney transplant recipients by general nephrologists: core curriculum 2019[J]. Am J Kidney Dis, 2019,73(6):866-879. doi:10.1053/j.ajkd.2019.01.031.

[2] Zhao S, Wu W, Lin X, et al. Protective effects of dexmedetomidine in vital organ injury: crucial roles of autophagy[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022,27(1):34. doi:10.1186/s11658-022-00335-7.

[3] Pefanis A, Ierino FL, Murphy JM, et al. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury[J]. Kidney Int, 2019, 96(2): 291-301. doi:10.1016/j.kint.2019.02.009.

[4] Chen Q, Liu X, Liu Z, et al. Tackling regulated cell death yields enhanced protection in lung grafts[J]. Theranostics, 2023, 13(13): 4376-4390. doi:10.7150/thno.87375.

[5] 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.

[6] Jia P, Teng J, Zou J, 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.

[7] Saeb-Parsy K, Martin JL, Summers DM, 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.

[8] Nirala NR, 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.

[9] Knijff LWD, van Kooten C, Ploeg RJ. 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.

[10] 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.

[11] Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, et al. Regulated cell death pathways in kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(5): 281-299. doi:10.1038/s41581-023-00694-0.