

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.20.009

右美托咪定减轻肠缺血再灌注模型大鼠肺损伤机制研究*

卢燕,何绮霞,陈翠平,朱艳雯,黄家益

(广东医科大学附属医院麻醉科,广东 湛江 524001)

摘要:目的 探讨右美托咪定减轻肠缺血再灌注模型大鼠肺损伤的作用机制。方法 将 30 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、观察组,各 10 只。3 组大鼠麻醉后经腹正中钝性分离,暴露肠系膜上动脉,对照组仅开腹 120 min,但不夹闭肠系膜上动脉,模型组、观察组夹闭肠系膜上动脉 60 min 后松夹再灌注 60 min,复制肠缺血再灌注大鼠模型,观察组在夹闭肠系膜上动脉前 10 min 尾静脉注射右美托咪定 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织病理形态学变化;以酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)、高迁移率族蛋白 1(HMGB1)水平及肺组织匀浆一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)水平,计算肺组织湿干质量比(W/D);以 Western blotting 法检测大鼠肺组织匀浆中 HMGB1、Toll 样受体 4(TLR4)、核因子 κB (NF- κB) 蛋白表达水平。**结果** 模型组大鼠肺组织结构严重破坏,肺泡腔内可见大量炎性细胞渗出,肺间质弥漫性水肿出血,而观察组大鼠肺组织仅有少许炎性细胞渗出及出血;与模型组比较,观察组大鼠血清 TNF- α 、IL-1、HMGB1 水平,肺组织匀浆中 NO 及 NOS 水平和 W/D 显著降低, HMGB1、TLR4、NF- κB 蛋白表达水平均显著降低。**结论** 右美托咪定预处理可减轻肠缺血再灌注模型大鼠急性肺损伤状态,其机制与抑制 HMGB1/TLR4/NF- κB 信号通路有关。

关键词:右美托咪定;肠缺血再灌注损伤;HMGB1/TLR4/NF- κB 通路;肺损伤;大鼠

中图分类号:R965;R971+.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)20-0030-04

Mechanism of Dexmedetomidine in Alleviating Lung Injury in Model Rats with Intestinal Ischemia-Reperfusion

LU Yan, HE Qixia, CHEN Cuiping, ZHU Yanwen, HUANG Jiayi

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong, China 524001)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of dexmedetomidine in alleviating lung injury in model rats with intestinal ischemia-reperfusion. **Methods** A total of 30 male SD rats were randomly divided into the control group, model group and observation group, 10 rats in each group. After anesthesia, the superior mesenteric artery was exposed through blunt separation of the abdominal median in the three groups. The rats in the control group were only operated for 120 min without clamping the superior mesenteric artery. In the model group and the observation group, the superior mesenteric artery of the rats was clamped, then loosened and reperfused for 60 min to replicate the rat model of intestinal ischemia-reperfusion. And the rats in the observation group were injected with 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of dexmedetomidine through the tail vein 10 min before clamping the superior mesenteric artery. The pathological changes of lung tissue of rats were observed by Hematoxylin-eosin(HE) staining. The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), and high mobility group protein B1 (HMGB1), the levels of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in lung homogenate of rats were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) method. The wet/dry quality ratio(W/D) of lung tissue was calculated. The expression levels of HMGB1, Toll-like receptor 4(TLR4) and nuclear factor kappa B(NF- κB) protein in the lung tissue homogenate of rats were detected by Western blotting. **Results** The lung tissue structure of rats was severely damaged, a large number of inflammatory cells exudated in the alveolar cavity, and pulmonary interstitial diffuse edema and hemorrhage could be seen in the model group, while only a few inflammatory cells exudated and hemorrhage in the lung tissue of the rats in the observation

*基金项目:2020 年度广东省医学科学技术研究基金项目[A2020539];2018 年度广东省湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目[2018A01035]。

第一作者:卢燕,男,硕士研究生,主任医师,研究方向为围术期器官保护,(电子信箱)249110951@qq.com。

- 58(9):1223-1232.
- [9] 李丽丽,裴方剑,王建群.“互联网+”背景下药师用药咨询服务创新模式研究[J]. 中医药管理杂志,2020,28(2):108-110.
- [10] 罗兰,李道成.妊娠期面瘫的针灸治疗探析[J]. 中国中医急症,2019,28(2):365-367.
- [11] 吴华,章友康.妊娠及哺乳期女性糖皮质激素和免疫抑制剂的合理应用[J]. 中华肾病研究电子杂志,2018,7(6):241-244.
- [12] MOTTA M, CIARDELLI L, MARCONI M, et al. Immune system

- development in infants born to mothers with autoimmune disease, exposed in utero to immunosuppressive agents[J]. Am J Perinatol, 2007,24(8):441-447.
- [13] 胡小姜,徐敏.甲钴胺的药理及临床作用[J]. 中国药师, 2000,3(2):100-102.
- [14] 王妍.疫情期间在线问诊激增,互联网医疗能否顺势崛起[J]. 新经产,2020(3):80-82.

(收稿日期:2020-11-06;修回日期:2021-04-05)

group. The levels of serum $\text{TNF}-\alpha$, $\text{IL}-1$, HMGB1 , the level of NO and NOS in lung homogenate and the W/D of rats in the observation group were significantly lower than those in the model group, while the expression levels of HMGB1 , TLR4 and $\text{NF}-\kappa\text{B}$ protein in the observation group were significantly higher than those in the model group. **Conclusion** Dexmedetomidine pretreatment can alleviate the state of acute lung injury in model rats with intestinal ischemia-reperfusion, and its mechanism is related to the inhibition of $\text{HMGB1/TLR4/NF}-\kappa\text{B}$ signal pathway.

Key words: dexmedetomidine; intestinal ischemia-reperfusion injury; $\text{HMGB1/TLR4/NF}-\kappa\text{B}$ pathway; lung injury; rat

肠缺血再灌注损伤是指肠道经过缺血后恢复血流,肠道组织不能恢复正常功能,且加重破坏肠道结构及其功能的病理过程^[1],可导致全身多个组织及器官受损,其中以肺最明显,可能与肠道缺血再灌注损伤时释放出的白细胞介素6($\text{IL}-6$)、肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF}-\alpha$)等炎性介质相关,可引起结构及功能破坏,导致肺毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞损伤,最终导致急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征等^[2-3]。李微微等^[4]已证实,高迁移率族蛋白1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核因子- κB ($\text{NF}-\kappa\text{B}$)信号通路参与肠缺血再灌注导致组织损伤。右美托咪定属 α_2 肾上腺素能受体激动剂,可保护缺血再灌注受损器官^[5-6]。 $\text{HMGB1/TLR4/NF}-\kappa\text{B}$ 信号通路是否在右美托咪定预处理抑制肠缺血再灌注诱导的肺损伤中发挥作用尚未清楚,本研究中对此进行了探讨,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:Eppendorf管、5417R型和5810R型离心机(德国Eppendorf公司),Sartorius BT223型天平(赛多利斯科学仪器公司),DYY-8型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),JS-300型凝胶图像分析仪(上海培清科技有限公司),PTC-100型PCR仪(美国PE公司)。

试剂:右美托咪定(江苏恒瑞医药公司,批号为170518BP);一氧化氮(NO)试剂盒、一氧化氮合酶(NOS)试剂盒(武汉博士德生物有限公司,批号为A00368); HMGB1 、 TLR4 、 $\text{NF}-\kappa\text{B}$ 抗体(美国Biotech公司,批号为19811-1-AP);DAB、蛋白酶K(美国Biovision公司,批号为9210-100);HRP溶液、TdT酶反应液(德国Boehringer Mannheim公司,批号为abx232556);2%戊巴比妥钠(美国Sigma公司)。

动物:健康雄性SPF级SD大鼠30只,15周龄,购自广东医科大学动物实验中心,动物生产许可证号SCXK(粤)2018-0008,体质量(285 ± 25)g。于动物实验中心适应性饲养1周。

1.2 方法

1.2.1 分组建模与给药

取SD大鼠30只,按随机数字表法分为对照组、模型组、观察组,各10只。在行肠道缺血手术前,模型组、观察组大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠40 mg/kg,麻醉完

成后从腹部正中切开、钝性分离、暴露肠系膜上动脉,用无创血管夹夹闭大鼠肠系膜上动脉60 min后松夹再灌注60 min,以复制肠缺血再灌注大鼠模型。对照组仅开腹120 min,不夹闭肠系膜上动脉。观察组在夹闭动脉前10 min尾静脉注射右美托咪定 $5 \mu\text{g/kg}$,对照组及模型组均给予等体积0.9%氯化钠溶液。

1.2.2 样本采集与检测

血清炎性细胞因子:大鼠于实验结束后取血,4℃下、3 000 r/min离心10 min,收集上清液,分装至无菌的Eppendorf管,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测 $\text{TNF}-\alpha$ 、白细胞介素1($\text{IL}-1$)和 HMGB1 水平。

肺组织病理形态学:处死大鼠,开胸,取左、右肺,在冰盐水中漂洗干净,将左下肺置10倍体积10%中性甲醛中固定,然后常规行组织石蜡包埋、切片及苏木素-伊红(HE)染色。

肺组织匀浆中 NO 及 NOS 水平:称取大鼠肺组织,0℃下以0.9%氯化钠溶液制备5%肺组织匀浆,37℃水浴20 min,检测 NO 及 NOS 水平。

肺组织湿干质量比(W/D):剖胸,取出大鼠右肺,立即用滤纸拭干肺组织表面水分、血液,用天平称得其质量,即得湿质量(W),将肺组织放入80℃烤箱烘烤48 h,再用天平称得其质量,即得干质量(D),计算 W/D 。

肺组织匀浆中 HMGB1 、 TLR4 、 $\text{NF}-\kappa\text{B}$ 蛋白表达:采用Western blotting法将肺组织、裂解液混合物置匀浆器中,充分研磨,冰上裂解30 min,3 000 r/min离心15 min,收集上清液,以BCA法检测蛋白含量。常规电泳、转膜、孵育,加入一抗,4℃孵育过夜,TBS缓冲液洗涤3次,加入相应二抗,室温孵育2 h,常规显影。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差检验,两组间比较行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

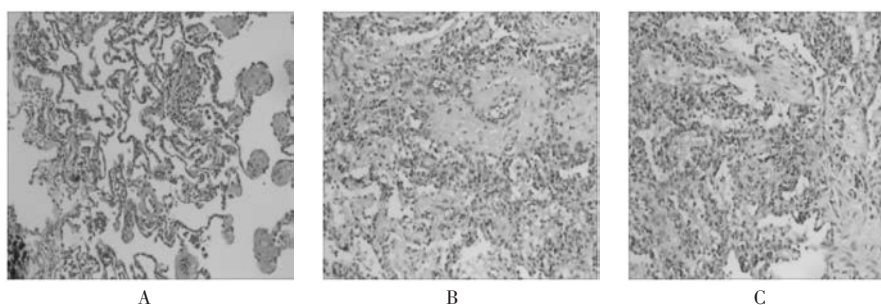
2 结果

2.1 肺组织病理形态学

模型组大鼠肺组织结构严重破坏,肺泡腔内可见大量炎性细胞渗出,肺间质弥漫性水肿、出血,观察组大鼠肺组织仅少许炎性细胞渗出及出血。详见图1。

2.2 血清炎性因子水平

与对照组比较,模型组大鼠血清 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1$,



A. 对照组 B. 模型组 C. 观察组
图1 3组大鼠肺组织形态学改变(HE, ×200)

A. Control group B. Model group C. Observation group

Fig.1 Morphological changes of lung tissue of rats in the three groups(HE, ×200)

HMGB1 水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,观察组大鼠上述指标水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

表1 3组大鼠炎症因子水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.1 Comparison of the inflammatory factors levels in the three groups ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-1(pg/mL)	HMGB1(ng/mL)
对照组	12.6 $\pm$ 2.1	20.7 $\pm$ 3.7	0.75 $\pm$ 0.2
模型组	44.4 $\pm$ 4.9 ^a	87.3 $\pm$ 10.8 ^a	3.21 $\pm$ 1.2 ^a
观察组	27.6 $\pm$ 3.2 ^b	41.7 $\pm$ 7.2 ^b	1.80 $\pm$ 0.6 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。表2、表3同。

Note: Compared with those in the control group, ^a $P < 0.05$; compared with those in the model group, ^b $P < 0.05$; as well as Tab. 2 and Tab. 3.

2.3 肺组织 NO, NOS 水平及 W/D

与对照组比较,模型组大鼠肺组织 NO, NOS 水平及 W/D 显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,观察组大鼠前述指标均显著降低($P < 0.05$)。详见表2。

表2 3组大鼠肺组织 NO, NOS 及 W/D 比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.2 Comparison of NO, NOS and W/D in lung tissues of rats in the three groups($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	NO(μ mol/g)	NOS(μ mol/g)	W/D
对照组	4.63 $\pm$ 0.61	3.47 $\pm$ 0.38	3.23 $\pm$ 0.48
模型组	8.84 $\pm$ 2.53 ^a	3.87 $\pm$ 0.53 ^a	6.26 $\pm$ 1.13 ^a
观察组	6.67 $\pm$ 1.33 ^b	3.57 $\pm$ 0.51 ^b	4.35 $\pm$ 0.88 ^b

2.4 肺组织中蛋白表达水平

与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 HMGB1, TLR4, NF- κ B 蛋白表达水平均显著升高;与模型组比较,观察组上述蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。详见图2、表3。

3 讨论

肠缺血再灌注发生后,其上皮通透性增加、水肿,黏膜屏障遭到破坏,甚至进展为肠源性败血症,严重时危及生命^[7-8]。既往研究证实,肠缺血再灌注可引起肠道损伤,本研究结果显示,模型组大鼠血清炎症因子水平较对照组升高,而观察组较模型组降低,说明肠缺血再

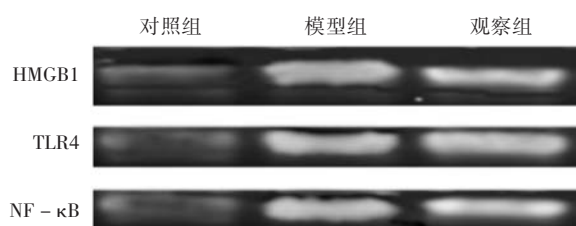


图2 3组大鼠肺组织中蛋白表达水平

Fig.2 Protein expression levels in lung tissues of rats in the three groups

表3 3组大鼠肺组织中蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Comparison of protein expression levels in lung tissues of rats in the three groups($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	HMGB1	TLR4	NF- κ B
对照组	100.6 $\pm$ 22.1	123.4 $\pm$ 26.8	93.2 $\pm$ 20.4
模型组	468.1 $\pm$ 88.4 ^a	555.6 $\pm$ 102.7 ^a	398.5 $\pm$ 78.9 ^a
观察组	234.9 $\pm$ 39.8 ^{ab}	289.5 $\pm$ 47.2 ^{ab}	213.5 $\pm$ 33.2 ^{ab}

灌注损伤可导致血清炎症因子大量释放,并且肠缺血再灌注不仅损伤肠道周围组织及器官,还可引起肺的急性炎症反应,从而导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[9-10]。肠缺血再灌注时释放的内毒素和细胞因子还可诱导肺内皮细胞和巨噬细胞产生,释放 NO 及 NOS^[11]。本研究中,模型组大鼠肺组织匀浆中 NO 和总 NOS 水平均有升高, W/D 显著增高,提示肠缺血再灌注诱发了大鼠肺组织炎症反应,导致急性肺损伤,而观察组上述指标显著降低;肺组织病理形态学显示,模型组大鼠肺组织结构被严重破坏,肺泡腔内可见大量炎症细胞渗出,肺间质弥漫性水肿、出血,而观察组肺组织仅有少许炎症细胞渗出及出血,说明右美托咪定能减轻肠缺血再灌注模型大鼠肺损伤的炎症反应。

已有实验证实, HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路与肠缺血再灌注损伤关系密切^[12-13],当发生肠缺血再灌注损伤时, HMGB1 与 TLR4 受体结合后激活 NF- κ B 启动与调节与免疫、炎症反应相关的基因表达,导致炎症因子释放及组织与器官损伤^[14]。而右美托咪定可通

过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路减轻心肌^[15]、脊髓^[16]及脑^[17]缺血再灌注损伤。本研究结果显示,肠缺血再灌注后模型组大鼠肺组织匀浆中 HMGB1, TLR4, NF- κ B 表达水平均升高,而观察组上述各指标表达水平下降,提示肠缺血再灌注诱导肺损伤时 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路被激活,右美托咪定可减轻肠缺血再灌注模型大鼠肺损伤与该信号通路有关。

右美托咪定属 α_2 受体激动剂,通过与 α_2 受体结合而发挥抑制交感神经及刺激迷走神经的双重作用,并兼具镇静、镇痛、抗炎等作用^[18],临床用于苏醒期镇静、术后镇痛、延长神经阻滞时间、围术期器官保护等^[19-21],近年来学者关注其抗炎及保护缺血再灌注器官的作用^[6]。本研究结果显示,肠缺血再灌注后给予右美托咪定,模型大鼠肺组织病理结构得到明显改善,血清炎症因子水平,以及肺组织匀浆中 NO, NOS 水平, W/D 和 HMGB1, TLR4, NF- κ B 蛋白表达水平均显著降低。

综上所述,右美托咪定预处理可减轻肠缺血再灌注模型大鼠急性肺损伤状态,其机制与抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路有关。

参考文献

- [1] MURPHY KP, TWOMEY M, MCLAUGHLIN PD, et al. Imaging of ischemia, obstruction and infection in the abdomen[J]. Radiol Clin North Am, 2015, 53(4): 847-869.
- [2] BREITHAUPT - FALOPPA AC, FANTOZZI ET, DE ASSIS RAMOS MM, et al. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide[J]. Shock, 2013, 40(3): 203-209.
- [3] DEITCH EA. Gut - origin sepsis: Evolution of a concept[J]. Surgeon, 2012, 10(6): 350-356.
- [4] 李徽徽, 仇大鹏, 高 琴, 等. 选择性激动黑皮质素 4 型受体 (MC4R) 通过 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号途径对抗大鼠腺病毒致急性肝损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(8): 1055-1059.
- [5] CAI Y, XU H, YAN J, et al. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(5): 1542-1550.
- [6] BELL MT, PUSKAS F, BENNETT DT, et al. Dexmedetomidine, an α -2a adrenergic agonist, promotes ischemic tolerance in a murine model of spinal cord ischemia - reperfusion[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 147(1): 500-506.
- [7] MITSUOKA H, SCHMID - SCHÖNBEIN GW. Mechanisms for blockade of *in vivo* activator production in the ischemic intestine and multi - organ failure[J]. Shock, 2000, 14(5): 522-527.
- [8] STALLION A, KOU TD, LATIFI SQ, et al. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation[J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(3): 470-477.
- [9] VASILEIOU I, KALIMERIS K, NOMIKOS T, et al. Propofol prevents lung injury following intestinal ischemia - reperfusion[J]. J Surg Res, 2012, 172(1): 146-152.
- [10] JAMES IA, CHEN CL, HUANG G, et al. HB - EGF protects the lungs after intestinal ischemia/reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2010, 163(1): 86-95.
- [11] WAISMAN D, BROD V, DICKSTEIN R, et al. Effects of inhaled nitric oxide on lung injury after intestinal ischemia - reperfusion in rats[J]. Shock, 2005, 23(2): 150-155.
- [12] 杨廷芳, 王兴勇, 胡语航, 等. NF- κ B 和 HMGB1 在大鼠肠缺血再灌注肺损伤中的表达及白藜芦醇的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(1): 24-28.
- [13] ZOU L, ATTUWAYBI B, KONE BC. Effects of NF - kappa B inhibition on mesenteric ischemia - reperfusion injury [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(4): G713-G721.
- [14] DING HS, YANG J, GONG FL, et al. High mobility group [corrected] box 1 mediates neutrophil recruitment in myocardial ischemia - reperfusion injury through toll like receptor 4 related pathway[J]. Gene, 2012, 509(1): 149-153.
- [15] YANG YF, PENG K, LIU H, et al. Dexmedetomidine preconditioning for myocardial protection in ischaemia - reperfusion injury in rats by downregulation of the high mobility group box 1 - toll - like receptor 4 - nuclear factor κ B signalling pathway[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017 44(3): 353-361.
- [16] LIU J, ZHANG SS, FAN XN, et al. Dexmedetomidine Preconditioning Ameliorates Inflammation and Blood - Spinal Cord Barrier Damage After Spinal Cord Ischemia - Reperfusion Injury by Down - Regulation High Mobility Group Box 1 - Toll - Like Receptor 4 - Nuclear Factor κ B Signaling Pathway[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2019, 44(2): E74-E81.
- [17] ZHAI YY, ZHU YY, LIU JJ, et al. Dexmedetomidine Post - Conditioning Alleviates Cerebral Ischemia - Reperfusion Injury in Rats by Inhibiting High Mobility Group Protein B1 Group (HMGB1)/Toll - Like Receptor 4 (TLR4)/Nuclear Factor kappa B (NF - κ B) Signaling Pathway[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e918617. doi:10.12659/MSM.918617.
- [18] 庞 刚, 周 伊, 李 军, 等. 腹横肌平面阻滞术联合右美托咪定对妇科腹腔镜手术患者苏醒质量和应激指标的影响[J]. 中国药业, 2020, 29(18): 85-88.
- [19] WEERINK MAS, STRUYS MMRF, HANNIVOORT LN, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamic of dexmedetomidine[J]. Clin Pharmacokinet, 2017, 56(8): 893-913.
- [20] 吴金棒, 张波涛, 孙超帅, 等. 不同剂量右美托咪定联合芬太尼对 ICU 机械通气患者术后转归的影响[J]. 中国药业, 2020, 29(22): 51-53.
- [21] TAYLOR RW, MANGANARO L, O'BRIEN J, et al. Impact of allogenic packed red blood cell transfusion on nosocomial infection rates in the critically ill patient[J]. Crit Care Med, 2002, 30(10): 2249-2254.

(收稿日期: 2020-10-06; 修回日期: 2021-04-07)