

· 基础研究 ·

右美托咪定预处理对急性肺损伤大鼠的保护作用

葛东建, 祁 宾, 李金玉

(南京医科大学附属淮安第一医院麻醉科, 江苏淮安 223300)

摘要:目的 探讨 Akt 信号通路在右美托咪定预处理对抗脂多糖(LPS)致急性肺损伤(ALI)中的作用。方法 成年 SD 大鼠 24 只,随机分为对照组(T0 组)、LPS 注射后 1 h(T1 组)、3 h(T2 组)和 6 h 组(T3 组),检测肺组织中 Akt 和 p-Akt 的含量。大鼠 54 只随机分为对照组(C 组)、ALI 6 h 组(ALI 组)和右美托咪定+ALI 6 h 组(D+ALI 组),检测 p-Akt 表达、肺泡灌洗液(BALF)蛋白浓度、细胞凋亡指数,观察肺组织病理变化。大鼠 40 只随机分为 ALI 组和 D+ALI 组,观察 48 h 生存率。结果 与 T0 组比较,T1、T2 和 T3 组 p-Akt 表达依次减少($P<0.05$)。与 ALI 组比较,D+ALI 组 p-Akt 表达明显升高($P<0.05$),但仍低于 C 组($P<0.05$),BALF 蛋白浓度,细胞凋亡指数均降低($P<0.05$),但仍高于 C 组($P<0.05$);D+ALI 组病理损伤较 ALI 组减轻。D+ALI 组 48 h 生存率明显高于 ALI 组($P<0.05$)。结论 右美托咪定可能通过增加 ALI 组织中 p-Akt 的浓度发挥保护作用。

关键词:右美托咪定;急性肺损伤;脂多糖类;p-Akt

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.028

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3405-03

The protective effect of dexmedetomidine preconditioning on acute lung injury in rats

Ge Dongjian, Qi Bin, Li Jinyu

(Department of Anesthesiology, Huai'an First People's Hospital, Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Akt signaling in the protective effect of dexmedetomidine preconditioning on the lipopolysaccharide(LPS)-induced acute lung injury(ALI) in rat. **Methods** Twenty-two SD rats were randomly divided into 4 groups: before LPS injection group(T0 group), 1 h after LPS injection group(T1 group), 3 h after LPS injection group(T2 group) and 6 h after LPS injection group(T3 group), the expression of Akt and p-Akt in the process of LPS-induced ALI was investigated. Another 54 rats were divided into 3 groups: control group(C group), 6 hours of ALI group(ALI group) and Dexmedetomidine+ALI group(D+ALI group), the expression of p-Akt in lung tissues, the protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid(BALF), apoptotic index and the pathological changes in the lung tissues were observed. Forty rats were divided into ALI group and ALI + D group to investigate the 48 h-survival ratio. **Results** Compared with T0 group, the level of p-Akt expression in T1, T2, T3 groups were decreased in a time-dependent manner($P<0.05$). Compared with ALI group, p-Akt in D + ALI group increased significantly($P<0.05$) but was still lower than that in C group($P<0.05$); the protein concentration in BALF and the apoptotic index in D + ALI groups were significantly lower than those in ALI group($P<0.05$), but still higher than those in C group($P<0.05$). The 48 h survival ratio was significantly decreased in D + ALI group comparing with ALI group($P<0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine preconditioning might display protective effect via activating p-Akt signaling pathway in LPS-induced ALI.

Key words: dexmedetomidine; acute lung injury; lipopolysaccharides; p-Akt

急性肺损伤(ALI)是临床上常见的危重症之一,由于其发病机制复杂,缺乏有效的治疗手段,病死率很高^[1]。右美托咪定是上世纪 90 年代开发的 α_2 受体激动剂,近来被证实对多个脏器具有保护作用^[2-4],但对 ALI 是否有效尚有待研究。Akt 信号通路在多种脏器功能障碍中发挥重要作用^[5-7]。本研究拟探讨右美托咪定对脂多糖(LPS)引起的 ALI 的影响以及 Akt 信号通路在其中的作用,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、分组及处理 清洁级雄性 SD 大鼠,200~250 g,由中科院上海实验动物中心提供。为研究 ALI 大鼠肺组织中 p-Akt 表达变化,随机将 24 只大鼠分为对照组(T0 组)、LPS 注射后 1 h(T1 组)、3 h(T2 组)和 6 h(T3 组)4 组($n=6$)。采用尾静脉注射 LPS 5 mg/kg 复制 ALI 模型,对照组仅注射等容量生理盐水,各组取肺组织行 Western blotting 检测 Akt 和 p-Akt 的表达变化。为研究右美托咪定对肺损伤有无保护作用,随机将 54 只大鼠分为 3 组($n=18$):对照组(C 组)、ALI 组、右美托咪定+ALI 组(D+ALI 组),ALI 组尾静

脉注射 LPS 5 mg/kg 制备模型,C 组给予等容量生理盐水,D+ALI 组在制作模型前连续腹腔注射右美托咪定 $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 4 \text{ h}^{-1}$ 3 次,末次注射后 30 min 注射 LPS。各组在模型制作后 6 h 取 6 只大鼠检查肺组织 p-Akt 表达,取 6 只大鼠检测肺泡灌洗液(BALF)蛋白浓度。每组另取 6 只大鼠用于计算细胞凋亡指数,观察肺组织病理学变化。T4 组和 ALI 组各有 3 只死亡,从本研究中剔除,重新补充以达到足够的样本量。另取大鼠 40 只,随机分为 ALI 组和 D+ALI 组,观察 48 h 内大鼠生存情况。

1.2 方 法

1.2.1 主要试剂 LPS 粉剂(0111;BL2630,100 mg/瓶)购自美国 Sigma 公司,右美托咪定购自江苏恒瑞制药有限公司(批号:H20090248);Western blotting 试剂盒和 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术研究, TUNEL 凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司,Akt(9272)和 p-Akt(4056)及其对应二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2.2 Western blotting 检测 p-Akt 和 Akt 表达 T0~T3 组

分别在各时间点将大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg, 3%)麻醉后,腹主动脉放血处死,开胸暴露双肺,取右肺中叶,立即冻存于液氮中备匀浆;C组、ALI组和D+ALI组处理后取材处理同上。参照参考文献[8]描述的方法提取蛋白质,用改良的Lowry法测定总蛋白浓度后配平,配平后的蛋白质样本加入4×上样缓冲液,95℃变性10 min后于-20℃保存。取等质量蛋白样本采用12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,以半干转法转至NC膜上。NC膜在室温下经5%脱脂牛奶封闭3 h后分别加入抗Akt或p-Akt一抗(1:1 000)4℃过夜。次日,NC膜经洗膜液洗膜3遍,每次15 min,加入碱性磷酸酶标记二抗(1:2 000)室温孵育2 h,洗膜液洗膜3遍,每次15 min,采用NBT/BCIP试剂盒显色。扫描条带,采用Photoshop CS 5.0分析条带灰度值,以灰度值反映蛋白表达水平。

1.2.3 肺灌洗液蛋白浓度测定 C组、ALI组和D+ALI 3组动物在处理6 h麻醉(戊巴比妥钠,60 mg/kg,腹腔注射),开胸并用预冷的PBS(5 mL)灌洗左肺3次,支气管灌洗液(BALF)回收率达90%以上,回收的BALF经离心(14 000 r/min,30 min,4℃)后按照参考文献[9]采用Bradford法测定595 nm处样本蛋白浓度。

1.2.4 苏木素-伊红(HE)染色 3组动物在麻醉后(戊巴比妥钠,60 mg/kg,腹腔注射)后开胸取右肺下叶置于4%多聚甲醛4℃下后固定隔夜,石蜡包埋制成蜡块,切成5 μm连续切片,行常规HE染色后观察病理学变化并摄影。

1.2.5 Tunnel法检测细胞凋亡 3组动物在麻醉后(戊巴比妥钠,60 mg/kg,腹腔注射)后开胸取右肺下叶置于4%多聚甲醛4℃下后固定隔夜,石蜡包埋制成蜡块,切成5 μm连续切片,采用TUNEL试剂盒检测细胞凋亡,400×光镜下随机选取10个视野,按照参考文献[10]描述的方法计算细胞凋亡指数:凋亡指数=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.2.6 动物48 h生存率 取大鼠40只,随机分为ALI组和

D+ALI组,处理后观察48 h内大鼠生存情况。生存率=存活数/总数×100%。

1.3 统计学处理 所有数据采用SPSS16.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验,生存率分析采用Kaplan-Meier检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALI大鼠p-Akt表达结果 与T0组比较,T1、T2和T3组肺组织p-Akt表达依次减少($P < 0.05$),T3组表达少于T1组和T2组($P < 0.05$),T2组表达少于T1组($P < 0.05$)。见表1。

表1 T0、T1、T2和T3组t-Akt和p-Akt表达变化(像素, $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	t-Akt(灰度值)	p-Akt(灰度值)
T0组	39 775.39±1 272.80	36 674.39±850.85
T1组	37 063.54±1 186.00	21 044.85±673.44 ^a
T2组	41 164.54±1 317.30	13 074.23±418.38 ^{ab}
T3组	37 691.93±1 206.10	7 782.23±249.03 ^{abc}

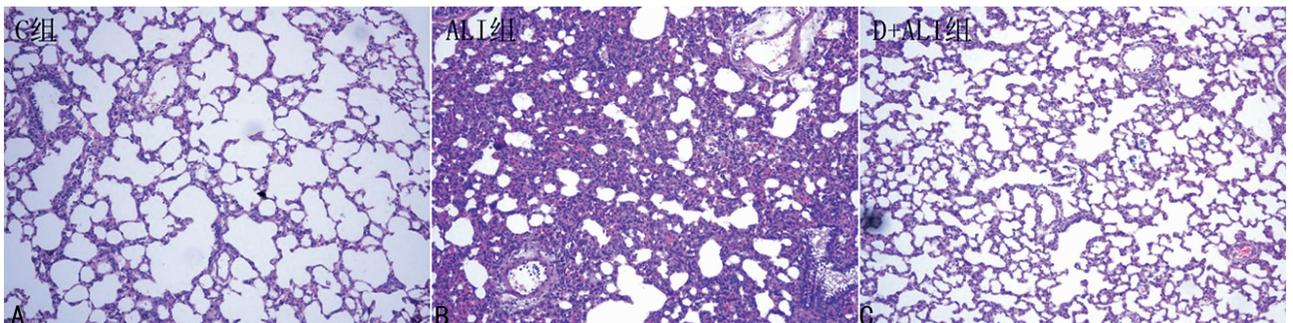
^a: $P < 0.05$,与T0组比较;^b: $P < 0.05$,与T1组比较;^c: $P < 0.05$,与T2组比较。

2.2 右美托咪定预处理结果 与C组比较,ALI组肺组织中p-Akt表达明显降低($P < 0.05$);与ALI组比较,D+ALI组肺组织中p-Akt表达明显升高($P < 0.05$),但仍低于正常水平。与C组比较,ALI组BALF中蛋白浓度和细胞凋亡指数明显升高($P < 0.05$);与ALI组比较,D+ALI组上述指标均明显降低($P < 0.05$),但仍高于正常水平。见表2。C组肺组织结构正常;ALI组肺组织结构破坏明显,出现肺泡内出血、肺间质水肿、肺泡萎陷和炎性细胞浸润等急性肺损伤的表现;D+ALI组肺泡结构基本完整、间隔少许增宽,出血水肿、肺泡萎陷和炎性细胞浸润程度较ALI组明显减轻。见图1。

表2 C组、ALI组和D+ALI组t-Akt、p-Akt、BALF蛋白浓度和细胞凋亡指数的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	t-Akt(灰度值,像素)	p-Akt(灰度值,像素)	BALF蛋白浓度(mg/mL)	细胞凋亡指数(%)
C组	41 093.32±1 022.28	33 021.53±992.69	42.17±4.38	14.28±2.49
ALI组	40 024.03±890.43	8 232.71±863.22 ^a	87.30±7.49 ^a	45.38±4.42 ^a
D+ALI组	38 028.47±11 032.22	28 682.92±1 032.09 ^{ab}	49.39±5.21 ^{ab}	27.46±3.66 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与C组比较;^b: $P < 0.05$,与ALI组比较。



A:C组;B:ALI组;C:D+ALI组。

图1 C组、ALI组、D+ALI组肺组织病理学改变

2.3 生存率结果 ALI组大鼠48 h生存率为50%,D+ALI组生存率为80%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

按照参考文献描述的方法制备大鼠ALI模型^[11-12],结果发

现静脉注射LPS后,大鼠BALF中蛋白浓度和细胞凋亡指数增高,提示模型制作成功。本研究还提示在大鼠ALI模型中,肺组织中p-Akt分子的表达随着时间的推移逐渐降低,提示Akt信号通路的磷酸化可能参与了ALI的发生、发展过程。

右美托咪定是上世纪 80 年代开发的高选择性 α_2 受体激动剂,在体内主要通过激活 α_2 受体发挥作用,而后者激活可以进一步活化下游的 Akt 信号路参与病理或生理过程^[13]。有研究发现右美托咪定具有抗损伤、抗凋亡作用,Akt 信号通路的活化程度降低参与细胞凋亡过程^[14]。本研究发现,预先腹腔注射右美托咪定 $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 4 \text{h}^{-1}$ 3 次后,ALI 后 6 h 组 BALF 中蛋白浓度和细胞凋亡指数明显降低,病理学结果也提示肺组织病理学损伤减轻,这一结果证实右美托咪定预处理对 LPS 造成的 ALI 可能具有保护作用。另外,大鼠肺组织 p-Akt 较 ALI 组表达明显增加,提示右美托咪定预处理可能是通过活化 Akt 信号通路缓解 ALI 的症状。

本研究还发现,右美托咪定预处理可以明显提高 ALI 大鼠 48 h 内的生存率,提示右美托咪定可以有效改善 LPS 致 ALI 大鼠的生存情况。本研究只在 LPS 导致的 ALI 模型中进行了研究,在其他常用动物模型中右美托咪定是否也具有同样的保护作用尚有待研究,比如常用的缺血性休克导致的 ALI 模型^[15]。

综上所述,右美托咪定预处理可以改善 LPS 致 ALI 大鼠的症状和生存情况,右美托咪定可能是通过激活 α_2 受体后进一步激活 p-Akt 信号通路参与了这一过程。

参考文献:

- [1] York NL, Kane C. Trends in caring for adult respiratory distress syndrome patients[J]. *Dimens Crit Care Nurs*, 2012,31(3):153-158.
- [2] Zhang F, Ding T, Yu L, et al. Dexmedetomidine protects against oxygen-glucose deprivation-induced injury through the I2 imidazoline receptor-pi3k/akt pathway in rat c6 glioma cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012,64(1):120-127.
- [3] Li HP, Li X, He GJ, et al. The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Respirology*, 2004,9(1):25-32.
- [4] Sanders RD, Sun P, Patel S, et al. Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection: Impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2010,54(6):710-716.
- [5] Jiang S, Zhu W, Li C, et al. Alpha-lipoic acid attenuates lps-induced cardiac dysfunction through a pi3k/akt-dependent mechanism [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013,16(1):100-107.

- [6] Lee KH, Yoo CG. Simultaneous inactivation of gsk-3beta suppresses quercetin-induced apoptosis by inhibiting the jnk pathway [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013,304(11):5.
- [7] Zhao MM, Yang JY, Wang XB, et al. The pi3k/akt pathway mediates the protection of so(2) preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013,34(4):501-506.
- [8] Ruan JP, Zhang HX, Lu XF, et al. Ephrins/ephbs signaling is involved in modulation of spinal nociceptive processing through a mitogen-activated protein kinases-dependent mechanism [J]. *Anesthesiology*, 2010,112(5):1234-1249.
- [9] Wang CG, Lu XF, Wei JQ, et al. Activation of the spinal extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway contributes to morphine physical dependence in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2011,494(1):38-43.
- [10] Li HP, Li X, He GJ, et al. The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Respirology*, 2004,9(1):25-32.
- [11] Choi JS, Lee HS, Seo KH, et al. The effect of post-treatment n-acetylcysteine in lps-induced acute lung injury of rats [J]. *Tuberc Respir Dis*, 2012,73(1):22-31.
- [12] Tai WL, Dong ZX, Zhang DD, et al. Therapeutic effect of intravenous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation on early-stage lps-induced acute lung injury in mice [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2012,32(3):283-290.
- [13] Musch MW, Arvans DL, Paris H, et al. Alpha2-adrenergic receptors attenuate secretagogue-induced endocytosis and promote exocytosis of intestinal nhe2 and nhe3 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009,330(3):818-825.
- [14] 文翠月,陈碧. CD95 酪氨酸磷酸化与细胞凋亡的分子关系 [J]. *国际检验医学杂志*, 2010,31(6):581-583.
- [15] 赵云,但伶,黄燕. 盐酸戊乙奎醚预处理对大鼠失血性休克致急性肺损伤时 p38MAPK 信号通路的影响 [J]. *激光杂志*, 2010,31(5):82-85.

(收稿日期:2013-05-04 修回日期:2013-05-28)

(上接第 3404 页)

- 伤骨科杂志, 2009,11(4):346-350.
- [8] Altay M, Ozkurt B, Aktekin CN, et al. Treatment of unstable thoracolumbar junction burst fractures with short- or long-segment posterior fixation in magerl type a fractures [J]. *Eur Spine J*, 2007,16(8):1145-1155.
- [9] Brantiganetal JW, Neidre A, Toohey JS. The lumbar I/F cage for posterior lumbar interbody fusion with the variable screw placement system; 10-year results of a food and drug administration clinical trial [J]. *Spine J*, 2004,4(6):681-688.
- [10] Ruan D, He Q, Ding Y, et al. Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease:

a preliminary study [J]. *Lancet*, 2007,369(9566):993-999.

- [11] Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, et al. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1998,23(23):2493-2506.
- [12] Itoh H, Asou Y, Hara Y, et al. Enhanced type X collagen expression in the extruded nucleus pulposus of the chondrodystrophoid dog [J]. *J Vet Med Sci*, 2008,70(1):37-42.

(收稿日期:2013-05-17 修回日期:2013-05-25)