

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.03.002

右美托咪定对氧糖剥夺再复氧下 Huvecs 的保护机制*

姚浩旗¹,汪惠文¹,王公孝¹,杨天德²,陈 建^{3△}

(1. 联勤保障部队第九四〇医院麻醉科,兰州 730050;2. 重庆医科大学第三附属医院麻醉科 401120;
3. 陆军军医大学高原军事医学系,重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨右美托咪定(DEX)预处理对氧糖剥夺再复氧条件下人脐静脉内皮细胞(Huvecs)的保护机制。**方法** 人工培养 Huvecs,实验分为 2 部分,氧糖剥夺前细胞分 3 组:对照组(NC 组)、DEX 组、DEX+育亨宾(YHB)组。DEX 组、DEX+YHB 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEX 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 YHB 处理细胞 2 h,DEX 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEX 处理细胞 2 h。氧糖剥夺再复氧后细胞分为 4 组:对照组(NC 组)、ogd/r 组、DEX+ogd/r 组、DEX+YHB+ogd/r 组。DEX+ogd/r 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ DEX 预处理 2 h,DEX+YHB+ogd/r 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ DEX 和 100 $\mu\text{mol/L}$ YHB 处理 2 h,ogd/r 组加入等体积的 PBS,随后将 3 组细胞置于 Hank's 液中于缺氧恒温细胞培养箱内培养 12 h,之后换正常培养基置于常氧恒温培养箱内培养 4 h,NC 组置于正常条件下培养 18 h。采用 Western blot 检测各组 Huvecs 内部 AMP 依赖的蛋白激酶 α (AMPK α)磷酸化水平,通过 Seahorse 能量分析检测缺氧复氧前各组 Huvecs 线粒体呼吸功能。**结果** 与 NC 组相比,DEX 组线粒体基础氧耗速率升高 ($P<0.05$),最大氧气消耗速率升高 ($P<0.05$),线粒体三磷酸腺苷(ATP)产生能力升高 ($P<0.05$);与 DEX 组相比,DEX+YHB 组线粒体基础氧耗速率降低 ($P<0.05$),最大氧气消耗速率降低 ($P<0.05$),线粒体 ATP 产生能力降低 ($P<0.05$);与 ogd/r 组相比,DEX+ogd/r 组 AMPK α 磷酸化水平升高 ($P<0.05$);与 DEX+ogd/r 组相比,DEX+YHB+ogd/r 组 AMPK α 磷酸化水平降低 ($P<0.05$)。**结论** DEX 预处理激活 AMPK α 分子可提高 Huvecs 的线粒体呼吸功能,减轻氧糖剥夺再复氧条件下的损伤。

[关键词] 人脐静脉内皮细胞;右美托咪定;氧糖剥夺再复氧;AMP 依赖的蛋白激酶 α

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2022)03-0366-04

The protective mechanism of dexmedetomidine on Huvecs under oxygen-glucose deprivation and reoxygenation*

YAO Haoqi¹,WANG Huiwei¹,WANG Gongxiao¹,YANG Tiande²,CHEN Jian^{3△}

(1. Department of Anesthesiology, the 940th hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China;
3. Department of Plateau Military Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective mechanism of dexmedetomidine (DEX) preconditioning on human umbilical vein endothelial cells (Huvecs) under oxygen and glucose deprivation and reoxygenation. **Methods** The Huvecs were cultured artificially. The experiment was divided into two parts. Before oxygen glucose deprivation, the cells were divided into three groups: the control group (normal contrast, NC), the DEX group and the DEX+yohimbine (YHB) group. The cells in the DEX+YHB group were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ DEX and 100 $\mu\text{mol/L}$ YHB for two hours, while the cells in the DEX group were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ DEX for two hours. After oxygen-glucose deprivation and reoxygenation, the cells were divided into the NC group, the ogd/r group, the DEX+ogd/r group and the DEX+YHB+ogd/r group. The DEX+ogd/r group was pretreated with 50 $\mu\text{mol/L}$ DEX for two hours; the DEX+YHB+ogd/r group was treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ DEX and 100 $\mu\text{mol/L}$ YHB for two hours and the ogd/r group was treated with equal volume of phosphate buffered solution(PBS). Western blot was used to detect the level of AMP-dependent protein kinase

* 基金项目: 国家科技重大专项课题(2018ZX09J18109-002-002)。 作者简介: 姚浩旗(1991-), 主治医师, 硕士, 主要从事围术期器官保护与缺血再灌注损伤的研究。 △ 通信作者, E-mail: jchenone@163.com。

α (AMPK α) phosphorylation in Huvecs of each group. Seahorse energy analysis was used to detect the mitochondrial respiratory function of Huvecs in each group before hypoxia and reoxygenation. **Results** Compared with those of the NC group, the mitochondrial basic oxygen consumption rate ($P < 0.05$), the maximum oxygen consumption rate ($P < 0.05$) and the mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) production capacity ($P < 0.05$) increased in the DEX group. Compared with those DEX group, the mitochondrial basic oxygen consumption rate ($P < 0.05$), the maximum oxygen consumption rate ($P < 0.05$) and the mitochondrial ATP production capacity ($P < 0.05$) decreased in the DEX+YHB group. Compared with that of the ogd/r group, the phosphorylation level of AMPK α in the DEX+ogd/r group increased ($P < 0.05$). Compared with that of the DEX+ogd/r group, the phosphorylation level of AMPK α in the DEX+YHB+ogd/r group decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** DEX preconditioning activates AMPK α molecule to improve the mitochondrial respiratory function of Huvecs and reduces the damage under the condition of oxyglucose deprivation and reoxygenation.

[Key words] human umbilical vein endothelial cells; dexmedetomidine; oxygen glucose deprivation/reoxygenation; AMPK α

右美托咪定 (DEX) 是高选择性的 α_2 受体激动剂^[1], 近期研究发现其有减轻器官缺血再灌注损伤的作用^[2-3]。而本课题组前期实验研究发现 DEX 预处理可以减轻人脐静脉内皮细胞 (Huvecs) 在氧糖剥夺再复氧条件下的损伤^[4], 但具体的细胞内分子机制还有待于进一步深究。为此本研究拟在前期研究的基础上探究 DEX 预处理对 Huvecs 的保护机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株 Huvecs (由陆军军医大学高原军事医学系赠) 复苏后培养于含 10% 胎牛血清的高糖培养基内, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中贴壁培养。当细胞约 80% 融合时, 用 0.05% 胰蛋白酶消化传代培养。

1.2 试剂药物

DEX: 江苏恒瑞制药有限公司; 高糖培养基 (DMEM)、胎牛血清: 美国 Gibico 公司; α_2 受体激动剂抑制剂育亨宾 (YHB): 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 山羊抗兔 IgG: 上海碧云天生物科技公司。 β -actin: 上海贝博生物, BB-2101; AMP 依赖的蛋白激酶 α (AMPK α)、磷酸化 AMPK α (p-AMPK α) 一抗: 德国 CST 公司。Seahorse 能量分析试验材料: 海马生物科技有限公司。

1.3 仪器设备

二氧化碳细胞培养箱 (美国 Themofisher Scientific 公司); Seahorse 细胞能量代谢实时测定仪 (美国 Agilent 公司); 电泳仪、全自动酶标仪化学发光曝光仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 分组

取对数生长期的细胞消化后接种于直径 3.5 cm 培养皿或 Seahorse 检测板中培养。实验分 2 部分, 氧

糖剥夺前细胞分 3 组: 对照组 (NC 组)、DEX 组、DEX+YHB 组。DEX+YHB 组加入 50 μ mol/L 的 DEX 和 100 μ mol/L YHB 处理细胞 2 h, DEX 组加入 50 μ mol/L 的 DEX 处理细胞 2 h。氧糖剥夺再复氧后细胞分 4 组: 对照组 (NC 组)、ogd/r 组、DEX+ogd/r 组、DEX+YHB+ogd/r 组。DEX+ogd/r 组加入 50 μ mol/L 的 DEX 预处理 2 h, DEX+YHB+ogd/r 组加入 50 μ mol/L 的 DEX 和 100 μ mol/L YHB 处理 2 h, ogd/r 组加入等体积的 PBS, 随后将 3 组细胞置于 Hank's 液中于缺氧恒温细胞培养箱内培养 12 h, 之后换正常培养基置于常氧恒温培养箱内培养 4 h, NC 组置于正常条件下培养 18 h。

1.5 Western blot 检测氧糖剥夺再复氧处理前、后各组 AMPK α 磷酸化水平

每组设置 3 个复孔, 将对数生长期细胞接种于直径 3.5 cm 的培养皿内, 实验处理后提取各组细胞蛋白进行 Western blot 检测。

1.6 细胞线粒体呼吸功能的 Seahorse 检测

每组设置 5 个复孔, 将对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化后, 接种于 Seahorse 检测板中, 进行线粒体呼吸功能检测, 具体方法参考胡洗瑜等^[5]研究。

1.7 统计学处理

采用 SPSS24.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时两两比较行 LSD 检验, 方差不齐时行 Mann-Whitney U 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEX 提高常氧条件下 Huvecs AMPK α 磷酸化水平

用 Western blot 检测氧糖剥夺前 Huvecs p-

AMPK α 水平。与NC组相比,DEX组AMPK α 磷酸化水平升高(NC组: 2.7625 ± 0.9290 ; DEX组: 4.5426 ± 0.7185 ; $n=3, P<0.05$);与DEX组相比,DEX+YHB组AMPK α 磷酸化水平降低(DEX组: 4.5426 ± 0.7185 ; DEX+YHB组: 2.8277 ± 0.0545 ; $n=3, P<0.05$),见图1。

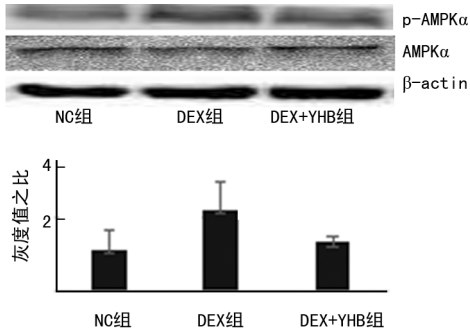


图1 DEX提高常氧条件下HuveCs AMPK α 磷酸化水平

2.2 DEX预处理提高HuveCs常氧条件下线粒体呼吸功能

通过Seahorse实验检测各处理组线粒体的呼吸能力。与NC组相比,DEX组线粒体基础氧气消耗速率、三磷酸腺苷(ATP)生成水平和最大氧气消耗速率升高(NC组: 60.7702 ± 11.3938 、 36.8068 ± 6.1271 、 95.9143 ± 17.2989 ; DEX组: 78.7807 ± 19.5163 、 48.5331 ± 14.1643 、 128.4745 ± 9.4695 ; $n=5, P<0.05$);与DEX组相比,DEX+YHB组HuveCs线粒体基础氧气消耗速率、ATP生成水平和最大氧气消耗速率均下降(DEX组: 78.7807 ± 19.5163 、 48.5331 ± 14.1643 、 128.4745 ± 9.4695 ; DEX+YHB组: 72.6296 ± 8.2881 、 42.7279 ± 10.8848 、 114.0850 ± 10.8865 ; $n=5, P<0.05$),见图2~4。

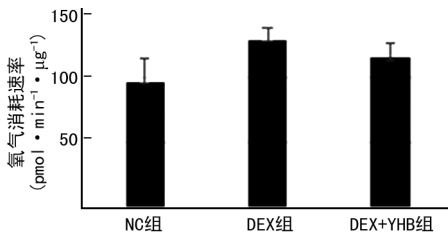


图2 DEX预处理提高HuveCs的最大呼吸速率

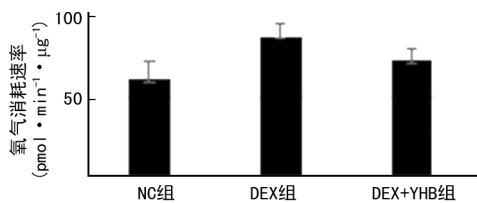


图3 DEX预处理提高HuveCs的基础呼吸速率

2.3 各组AMPK α 分子的磷酸化水平

与NC组相比,12 h的氧糖剥夺,4 h的再复氧可

以使HuveCs内部p-AMPK α 水平升高(NC组: 10.5039 ± 2.4796 , ogd/r组: 16.2169 ± 0.8832 , $n=3, P<0.05$);与ogd/r组相比,DEX+ogd/r组AMPK α 水平显著升高(ogd/r组: 16.2169 ± 0.8832 , DEX+ogd/r组: 33.4357 ± 8.8666 , $n=3, P<0.05$);与DEX+ogd/r组相比,DEX+YHB+ogd/r组p-AMPK α 水平降低(DEX+ogd/r组: 33.4357 ± 8.8666 , DEX+YHB+ogd/r组: 21.7296 ± 7.4065 , $n=3, P<0.05$),见图5。

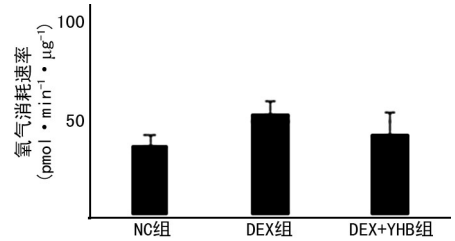


图4 DEX预处理提高HuveCs ATP的生成水平

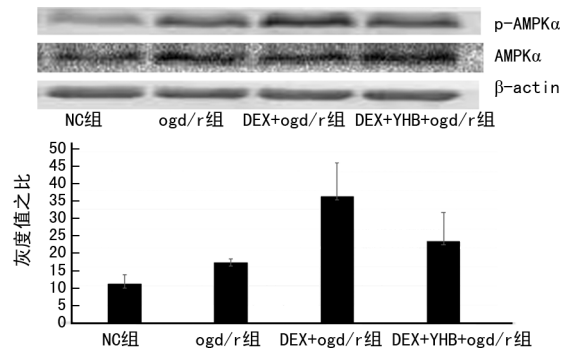


图5 DEX提高氧糖剥夺再复氧条件下HuveCs AMPK α 磷酸化水平

3 讨论

目前的研究证实DEX预处理对HuveCs具有保护作用^[4],而在体实验结果发现DEX可以激活AMPK发挥其在心肌缺血再灌注损伤中的抗氧化应激作用^[6],本研究在这些研究基础上,进一步发现了其对HuveCs的保护机制。本研究发现,相对于ogd/r组来说,DEX+ogd/r组HuveCs的p-AMPK α 水平上升;相对于DEX+ogd/r组来说,DEX+YHB+ogd/r组p-AMPK α 水平降低,这说明DEX预处理可能通过激活AMPK发挥其对HuveCs的保护作用,而该作用可以被YHB拮抗。本研究发现在氧糖剥夺再复氧前给予DEX预处理2 h既能明显提高p-AMPK α 水平,而YHB使DEX的效应有所逆转。近期有研究发现DEX对心肌缺血再灌注损伤的保护作用可能与AMPK α 依赖的自噬有关^[7],DEX也有可能通过自噬发挥对HuveCs的保护作用,这个推论需要进一步证实。AMPK α 分子被认为是细胞内部能量与代谢调节的关键分子之一,其在糖尿病、高脂血症、肥胖症等多种与代谢相关的疾病中均有重要作用^[8]。在大鼠糖尿

病模型中,DEX可以通过激活AMPK α 减轻氧化应激损伤^[9],同时在过氧化氢诱导的Huvecs损伤模型中,AMPK α 分子的激活对Huvecs有保护作用^[10-11],而缺氧复氧过程中氧化应激也是细胞损伤的主要机制之一。据此,作者推论:DEX通过激活AMPK α 减轻氧糖剥夺再复氧时Huvecs的氧化应激损伤,而其对血管内皮细胞通透性和死亡形式的影响,需要进一步探究。

DEX作为一种麻醉辅助药,能显著降低全麻手术患者应激和炎症反应水平,有助于改善患者的临床疗效^[12],动物实验如在脓毒症小鼠身上也证实其有抗炎作用^[13],而血管内皮细胞作为组织与血液的第一屏障,其在机体应激和炎症等病理生理过程中发挥着重要作用,血管内皮细胞也许是DEX发挥围术期器官保护作用的靶点之一。现有研究证实AMPK α 不仅对缺氧复氧条件下血管内皮细胞的功能有影响,并且参与了Huvecs炎症反应^[14];据此认为DEX可能会通过AMPK α 分子发挥其对Huvecs的抗炎作用,需要进一步的实验证实这个猜想并寻找该通路的下游靶分子。

AMPK α 分子被认为是细胞内部能量与代谢调节的关键分子之一,该分子的激活可以提高细胞对葡萄糖的摄取,抑制蛋白质、糖原和脂类的合成,促进糖类有氧化和脂类的分解代谢,从而为细胞提供更多能量^[15]。现有研究认为DEX可以提高293细胞的线粒体呼吸功能^[16],据此推测DEX可能是通过激活该分子改善了Huvecs的内部能量代谢,所以本研究还进行了线粒体呼吸功能检测。结果发现,相对于NC组来说,50 mol/L DEX明显提高了线粒体的有氧呼吸能力,同样用 $\alpha 2$ 肾上腺素受体的拮抗剂YHB之后,该作用被削弱。

综上所述,DEX在提高了p-AMPK α 水平后,会进一步影响线粒体的生物合成能力,线粒体的氧气消耗速率间接地反映了线粒体的有氧化水平和生物合成能力。在氧糖剥夺条件下,细胞是处于一种无氧无能量来源的状态,此时的细胞要适应这种极端环境需要一定的能量储备。在本研究中发现DEX预处理可以提高线粒体的有氧呼吸能力,使细胞在氧糖剥夺处理前细胞内部能量储备量升高,以满足Huvecs在氧糖剥夺状态下的能量需求。结合本课题组前期的实验结果,可以得出以下结论:DEX预处理通过激活 $\alpha 2$ 受体提高p-AMPK α 水平,p-AMPK α 可通过促进细胞对葡萄糖的摄取,促进生成能量的生物化学反应,抑制消耗能量的物质合成反应,提高线粒体的呼吸功能,增加细胞内部能量储备,这有利于Huvecs细胞适应氧糖剥夺的极端环境,利于细胞的生存,减轻细胞损伤,而DEX对Huvecs的通透性和死亡形式及

炎症反应的影响,需要进一步探索。

参考文献

- [1] 王花慧,赵文香,王建营,等.右美托咪定的药理特点及其在老年患者术后谵妄中的应用[J].吉林医学,2021,42(6):1496-1498.
- [2] 秦智刚,徐幼年,李锬.右美托咪定减轻脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤的作用[J].安徽医科大学学报,2021,56(1):72-76.
- [3] 张晓晓,李树华,杨华,等.右美托咪定预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤时HMGB1/TLR-4/NF- κ B信号通路的影响[J].医学综述,2021,27(14):2899-2903.
- [4] 姚浩旗,吴庆,黄河,等.右美托咪定预处理减轻氧糖剥夺再灌注条件下HUVECs的损伤[J].第三军医大学学报,2018,40(9):801-804.
- [5] 胡洸瑜,杨容金,孙芳芳,等.过表达Fas激活的丝氨酸/苏氨酸激酶减轻缺氧/复氧损伤导致的心肌细胞线粒体呼吸功能障碍[J].心脏杂志,2021,33(2):123-126,132.
- [6] 吴志林,朱轶.右美托咪定通过Trx1/AMPK通路减轻心肌缺血再灌注损伤中的氧化应激[J].华中科技大学学报(医学版),2020,49(4):404-407.
- [7] XIAO Y,LI J,QIU L,et al. DEXmedetomidine protects human cardiomyocytes against Ischemia-Reperfusion injury through $\alpha 2$ -Adrenergic receptor/AMPK-Dependent autophagy [J]. Front Pharmacol,2021,12:615424.
- [8] STAHMANN N,WOODS A,CARLING D,et al. Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase beta [J]. Mol Cell Biol,2006,26(16):5933-5945.
- [9] SUN Y,LI L L,WU J,et al. Germacrone cooperates with dexmedetomidine to alleviate high-fat diet-induced type 2 diabetes mellitus via up-regulating AMPK $\alpha 1$ expression [J]. Exp Ther Med,2019,18(5):3514-3524.
- [10] ZHENG Z D,WANG M,CHENG C L,et al. Ginsenoside Rb1 reduces H_2O_2 -induced HUVEC dysfunction by stimulating the sirtuin-1/AMP-activated protein kinase pathway [J]. Mol Med Rep,2020,22(1):247-256. (下转第369页)

- [6] HU Q, LUO F, ZHU S Y, et al. Staging of laryngeal carcinoma: comparison of high-frequency sonography and contrast-enhanced computed tomography[J]. *Clin Radiol*, 2012, 67(2): 140-147.
- [7] American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual* [M]. 7th ed. New York: Springer, 2010.
- [8] THAKRAR D B, SULTAN M J. The role of Contrast-Enhanced ultrasound in managing vascular pathologies[J]. *J Med Imaging Radiat Sci*, 2019, 50(4): 590-595.
- [9] CHONG W K, PAPADOPOULOU V, DAYTON P A. Imaging with ultrasound contrast agents: current status and future[J]. *Abdominal Radiology*, 2018, 43(4): 762-772.
- [10] MA X, ZHANG B, LING W, et al. Contrast-enhanced sonography for the identification of benign and malignant thyroid nodules: Systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Ultrasound*, 2016, 44(4): 199-209.
- [11] 沈红梅, 魏立爽, 李璐. 超声造影参数与甲状腺癌患者肿瘤恶性程度的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 34(3): 555-557.
- [12] 赵蓉, 印淑均, 王敏. TI-RADS 联合超声造影在甲状腺良恶性结节鉴别诊断中的应用价值[J]. *中国医学物理学杂志*, 2018, 35(3): 307-312.
- [13] 李新, 王慧芬, 张周龙. 声脉冲辐射力弹性成像及超声造影对甲状腺良恶性结节的鉴别诊断价值[J]. *重庆医学*, 2017, 46(27): 3779-3781.
- [14] XIA C X, ZHU Q, ZHAO H X, et al. Usefulness of ultrasonography in assessment of laryngeal carcinoma [J]. *Br J Radiol*, 2013, 86(130): 20130343.
- [15] DANKBAAR J W, OOSTERBROEK J, JAGER E A, et al. Detection of cartilage invasion in laryngeal carcinoma with dynamic contrast-enhanced CT [J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2017, 2(6): 373-379.
- [16] KUNO H, SAKAMAKI K, FUJII S, et al. Comparison of Mr imaging and Dual-Energy CT for the evaluation of cartilage invasion by laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Neur*, 2018, 39(3): 524-531.
- [17] PIETRAGALLA M, NARDI C, BONASERA L, et al. Current role of computed tomography imaging in the evaluation of cartilage invasion by laryngeal carcinoma [J]. *Radiol Med*, 2020, 125(12): 1301-1310.
- [18] RZEPAKOWSKA A, OSUCH-WÓJCIKIEWICZ E, BRUZGIELEWICZ A, et al. How useful is ultrasound in the assessment of local advancement of laryngeal cancer? [J]. *Otolaryngol Pol*, 2015, 69(2): 21-26.

(收稿日期: 2021-06-10 修回日期: 2021-11-10)

(上接第 374 页)

- [11] YANG M, LV H, LIU Q, et al. Colchicine alleviates cholesterol crystal-Induced endothelial cell pyroptosis through activating AMPK/SIRT1 pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9173530.
- [12] 吴梦鸽, 徐健, 吴长帅, 等. 术中持续泵注右美托咪定对全麻手术患者围术期应激, 炎症的影响: Meta 分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(2): 315-322.
- [13] KONG Q, WU X, QIU Z, et al. Protective effect of dexmedetomidine on acute lung injury via the upregulation of tumour necrosis Factor- α -Induced protein-8-like 2 in septic mice [J]. *Inflammation*, 2020, 43(3): 833-846.
- [14] RODRÍGUEZ C, MUÑOZ M, CONTRERAS C, et al. AMPK, metabolism, and vascular function [J]. *FEBS J*, 2021, 288(12): 3746-3771.
- [15] KIM J, YANG G, KIM Y, et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(4): e224.
- [16] KIYONAGA N, MORIYAMA T, KANMURA Y. Effects of dexmedetomidine on lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in rats and mitochondrial function in cell culture [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109912.

(收稿日期: 2021-06-28 修回日期: 2021-11-08)