

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.10.001

文章编号: 1005-8982(2016)10-0001-05

论著

盐酸右美托咪啉对缺血再灌注肾损伤小鼠的肾小管保护作用

卜林¹, 陈艳²

(徐州医学院附属医院 1.重症医学科, 2.肾脏内科, 江苏 徐州 221003)

摘要:目的 缺血再灌注肾损伤(IR)是围手术期常见的疾病,本研究通过构建缺血再灌注肾损伤模型,观察右美托咪啉(Dex)注射对受损肾小管的保护作用及机制。**方法** 将 60 只小鼠随机分为对照组、IR 模型组和 IR+Dex 组(简称 Dex 组),制备 IR 模型后 24 h 分别处死 3 组小鼠取肾组织。用全自动生化分析仪测定血肌酐(Scr)及尿素氮(BUN)。采用 HE 染色观察各组小鼠肾组织的形态,评定肾小管损伤程度;免疫组织化学染色测定低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达。**结果** 对照组的肾小管结构与形态均正常。IR 模型组肾小管损害明显、HIF-1 α 及 MCP-1 表达均增高。而 Dex 组肾小管损害程度较轻, HIF-1 α 及 MCP-1 表达均较 IR 模型组减低,肾小管上皮细胞低氧程度及炎症反应均较 IR 模型组明显减轻。Dex 组小鼠的血肌酐及尿素氮水平较 IR 模型组明显降低。**结论** Dex 可以通过抑制炎症反应、减轻肾小管上皮细胞低氧程度从而减轻 IR 小鼠肾小管的损害,保护肾脏功能。

关键词: 缺血再灌注损伤;肾小管上皮细胞;右美托咪啉

中图分类号: R692;R-332

文献标识码: A

Protective effect of Dexmedetomidin on kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion and its mechanism

Lin Bu¹, Yan Chen²

(1. Intensive Care Unit, 2. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221003, China)

Abstract: Objective To establish a mouse model of ischemia-reperfusion injury (IRI) and to investigate the protective effects of Dexmedetomidine (Dex) injection on renal tubules, so as to provide new available methods for acute kidney injury (AKI). **Methods** Sixty female mice were randomly divided into three groups: control group, renal IRI group and Dex group, with 20 mice in each group. The mice were sacrificed at the 24th hour after surgery, then the bilateral kidneys and blood samples were collected. The blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were measured by automatic biochemistry analyzer. HE staining was used to observe the pathology of the kidneys. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). **Results** There was no significant changes of renal tubules in the control group. In the renal IRI group, renal tubular epithelial cells were obviously damaged, and their expressions of HIF-1 α and MCP-1 noticeably increased. However, renal tubular injury in the Dex group was lighter than that of the IR group; the expressions of HIF-1 α and MCP-1, the hypoxia degree and inflammatory reaction of renal tubules as well as the levels of BUN and Scr of the Dex group were lower than those of the IR group. **Conclusions** It may

收稿日期: 2015-11-23

be naturally speculated that Dex can protect renal function through reducing inflammatory reaction and hypoxia degree of damaged renal tubular epithelial cells following renal IR.

Keywords: ischemia-reperfusion; tubular epithelial cell; Dexmedetomidin

围手术期急性肾损害(acute kidney injury, AKI)主要由包括手术在内的各种原因引起的肾脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)所致,表现为肾小球滤过率急剧减少,出现氮质血症^[1]。AKI是围手术期常见的并发症之一,也是重症监护病房(intensive care unit, ICU)常见的急危重症。肾脏缺血再灌注不仅使自身受损,还导致多器官功能障碍。尽管目前诊治手段大大改善,但 AKI 的发病率和病死率仍居高不下,造成住院时间延长,诊治费用增加,死亡率增高。

右美托咪啶(Dexmedetomidine, Dex)是一种新型的、特异性、高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂,具有镇静、镇痛、抗交感、稳定血流动力学和利尿作用^[2-3],目前主要用于 ICU 镇静和临床麻醉。本实验通过观察 Dex 注射对受损肾小管的保护作用及其机制,旨在为临床围手术期防治 AKI 发生提供新的理论和应用依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明小鼠 60 只,清洁级,体重 20~25 g,由徐州医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 兔抗免疫组织化学染色测定低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), β -Tubulin(美国 Santa Cruz 公司),兔抗单核细胞趋化蛋白 1(mononuclear macrophage antigen 1, MCP1) 单克隆抗体(Boster Biotechnology 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组 将 60 只小鼠随机分为对照组、IR 模型组和 Dex 组,每组 20 只。对照组:不做任何处理;IR 模型组:用 1.5%异氟烷诱导麻醉小鼠后将其放置于变温毯上,维持体温(36.0 ± 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 。常规备皮、消毒。沿腹部正中剪开皮肤,暴露腹白线,沿之剪开后暴露腹腔。轻轻推移肾周组织后分别用微血管夹夹闭左、右侧肾蒂,可以看到两侧肾脏颜色由鲜红变成暗红。然后将肾周组织归位,开放的腹腔用湿纱布覆盖。待双侧肾脏缺血 25 min 后,移除微血管夹,让肾脏重获血液灌注,可以看到肾脏颜色由暗

红变成鲜红。缝合关闭腹腔。24 h 后处死小鼠,取出肾组织备检。Dex 组:在 IR 模型组中肾脏获得再灌注后立即给予腹腔注射 Dex 25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.2.2 肾组织形态学检查 常规石蜡包埋,组织切片进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光学显微镜观察。肾小管损伤程度分析:每个标本随机选取 10 个视野,每个视野分别测量肾小管间质相对面积,按照 DJUDJAJ 等^[4]方法,按肾小管损伤程度将组织学评分分为 0~3:0=正常肾组织;1=中等程度损伤;3=肾小管坏死病变。进行组织学评分。

1.2.3 HIF-1 α 及 MCP1 的表达 标本石蜡包埋,连续切片,厚度 3 μm 。贴附于载玻片上,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘烤 3 h。常规脱蜡至水后,分别经 3%过氧化氢 H_2O_2 封闭,消除内源性过氧化物酶的活性。一抗:兔抗 HIF-1 α 多克隆抗体(1:100)、兔抗 MCP1 单克隆抗体(1:100);二抗:lgG 即用型 M.O.M.TM 免疫组织化学试剂盒,按 ABC 法进行染色,DAB 显色。均采用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),利用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算其积分光密度值(integral optical density, IOD),取其平均值。

1.2.4 Western blot 检测 HIF-1 α 表达 取新鲜肾组织加裂解液后匀浆、离心、取上清液测蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭,加一抗、二抗,显色剂显色处理。以 β -Tubulin 为参照,测定 HIF-1 α 蛋白的相对表达量,即各组 HIF-1 α / β -Tubulin ratio 值之间比较。

1.2.5 肾功能变化 在处死小鼠同时每只取静脉血 2 ml,在高速离心机上离心,吸取血清,在全自动生化分析仪上检测 BUN 及 Scr。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述;组间均数比较采用单因素方差分析。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,当 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏形态学变化

各组小鼠肾组织 HE 染色显示:对照组小鼠肾

组织结构形态正常;IR 模型组出现不同程度的肾小管扩张萎缩、空泡变性,肾小管上皮细胞扁平、核染色缺失、炎症细胞浸润;Dex 组小鼠肾脏组织病理改变较 IR 模型组明显减轻。见图 1。

各组小鼠肾脏组织组织学评分结果显示:对照组(0.23±0.01),IR 模型组(4.46±0.11),Dex 组(1.51±0.04),3 组间比较差异有统计学意义。见图 2。

2.2 肾组织 HIF-1α 免疫组织化学染色

对照组肾小管上皮细胞基本正常,HIF-1α 表达微弱。IR 模型组肾小管上皮细胞低氧严重,HIF-1α 表达显著增多。Dex 组小鼠肾脏组织病理改变较 IR 模型组明显减轻,HIF-1α 表达较 IR 模型组显著减少。见图 3。

各组小鼠肾组织 HIF-1α 染色 IOD 值比较,IR 模型组肾小管 HIF-1α 大量表达,而 Dex 组 HIF-1α 较 IR 模型组表达显著减少。3 组标本 IOD 值间比较差异有统计学意义。见图 4。

2.3 肾组织 MCP1 免疫组织化学染色

对照组肾小管上皮细胞基本正常,MCP1 表达微弱。IR 模型组肾小管损伤严重,炎症细胞浸润,MCP1 表达显著增多。Dex 组小鼠肾脏组织病理改变较 IR 模型组显著减轻,MCP1 表达较 IR 模型组显著减少。见图 5。

与对照组比较,IR 模型组肾小管 MCP1 大量表达(P=0.042)。而 Dex 组 MCP1 较 IR 模型组表达

显著减少(P=0.031)。3 组标本 IOD 值间比较差异有统计学意义。见图 6,表 1。

2.4 HIF-1α 蛋白表达

对照组 HIF-1α 蛋白表达微弱,IR 模型组 HIF-1α 蛋白大量表达,而 Dex 组 HIF-1α 蛋白表达水平较 IR 模型组显著降低。见图 7。

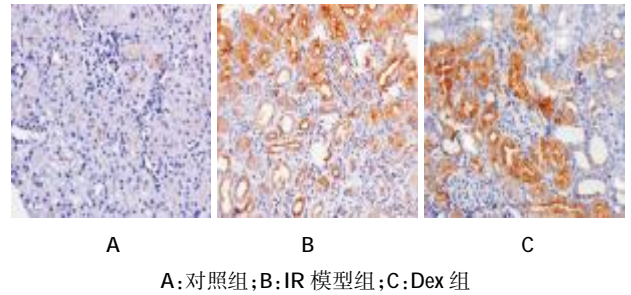
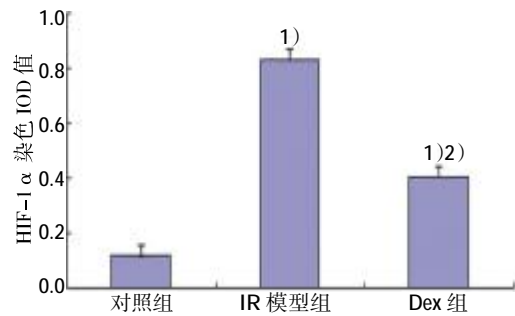
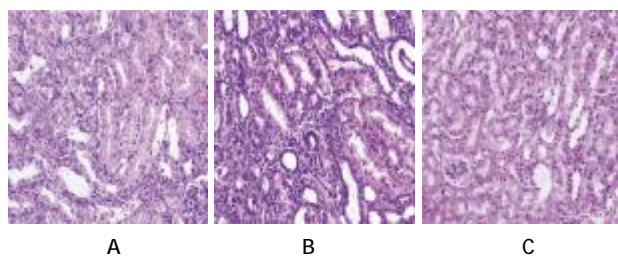


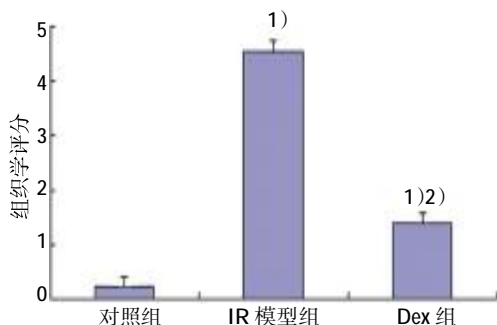
图 3 各组小鼠肾组织 HIF-1α 染色 (×40)



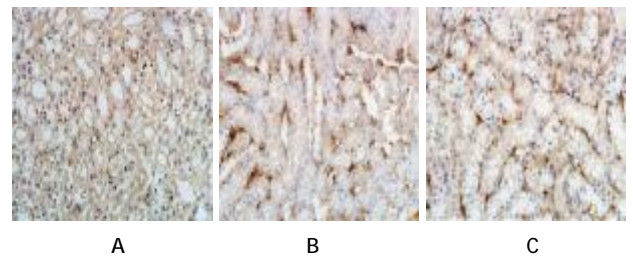
1)与对照组比较,P<0.05;2)与IR 模型组比较,P<0.05
图 4 各组小鼠肾组织 HIF-1α 染色 IOD 值比较



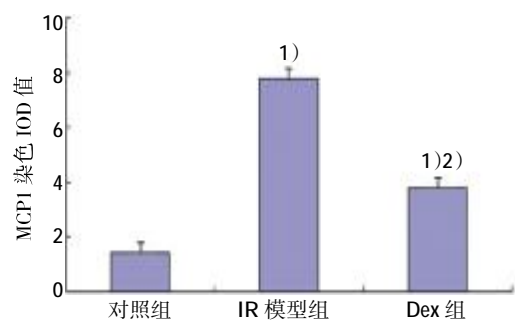
A:对照组;B:IR 模型组;C:Dex 组
图 1 各组小鼠肾组织 HE 染色 (×40)



1)与对照组比较,P<0.05;2)与IR 模型组比较,P<0.05
图 2 各组小鼠肾小管损伤程度组织学评分



A:对照组;B:IR 模型组;C:Dex 组
图 5 各组小鼠肾组织 MCP1 染色 (×40)



1)与对照组比较,P<0.05;2)与IR 模型组比较,P<0.05
图 6 各组小鼠肾组织 MCP1 染色 IOD 值比较

各组 HIF-1 α / β -Tubulin ratio 值之间比较:对照组 HIF-1 α 蛋白表达微弱, HIF-1 α / β -Tubulin ratio 值小, IR 模型组 HIF-1 α 蛋白大量表达, HIF-1 α / β -Tubulin ratio 值显著增加, 而 Dex 组 HIF-1 α 蛋白表达水平较 IR 模型组显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 8。

2.5 肾功能变化

双肾缺血 25 min 再灌注 24 h 后, 血浆肌酐水平从 (30.62 ± 2.55) μ mol/L 升高至 (78.34 ± 5.17) μ mol/L ($P = 0.004$), 血尿素氮水平从 (6.26 ± 0.34) mmol/L 升高至 (23.39 ± 4.15) mmol/L ($P = 0.006$)。缺血再灌注后应用 Dex 25 μ g/kg, 可显著改善 IR 之后的肾功能, 肌酐 (54.09 ± 3.27) μ mol/L ($P = 0.035$); 尿素氮 (18.33 ± 4.07) mmol/L ($P = 0.023$)。见表 2。

表 1 各组小鼠 24 h 免疫组织化学 IOD 值比较 ($n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α ($\times 10^3$)	MCP1 ($\times 10^2$)
对照组	0.15 \pm 0.03	1.82 \pm 0.02
IR 模型组	0.75 \pm 0.12 ¹⁾	7.62 \pm 0.13 ¹⁾
Dex 组	0.41 \pm 0.06 ²⁾	3.87 \pm 0.05 ²⁾

注: 1) 与同期对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与同期 IR 模型组比较, $P < 0.05$

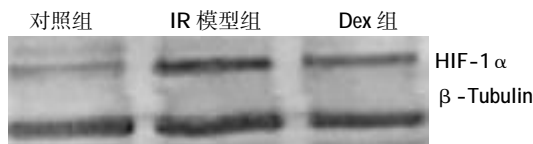
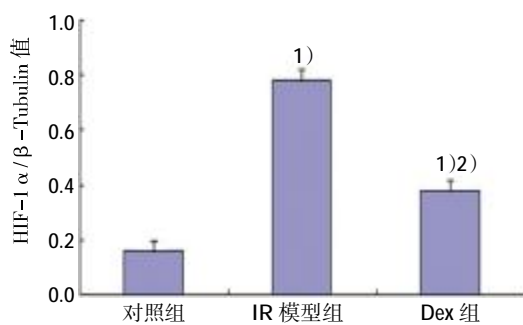


图 7 各组小鼠肾组织 HIF-1 α 蛋白表达



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 IR 模型组比较, $P < 0.05$

图 8 各组小鼠肾组织 HIF-1 α 蛋白表达比较

表 2 24 h 后 3 组小鼠血肌酐及尿素氮比较 ($n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别	Scr/(μ mol/L)	BUN/(mmol/L)
对照组	30.62 \pm 2.55	6.26 \pm 0.34
IR 模型组	78.34 \pm 5.17 ¹⁾	23.39 \pm 4.15 ¹⁾
Dex 组	54.09 \pm 3.27 ¹⁾²⁾	18.33 \pm 4.07 ¹⁾²⁾

注: 1) 与同期对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与同期 IR 模型组比较, $P < 0.05$

3 讨论

肾脏缺血再灌注损伤是一个复杂的过程, 休克、体外循环术后、围产期窒息等过程常发生肾缺血性损伤, 严重者将导致急性肾功能衰竭的发生, 也是患者入住 ICU 的主要原因。肾 IR 损伤病变的本质包括肾小管可逆性非致死性功能障碍和致死性损伤^[5]。近年来, 研究认为, 凋亡和炎症反应在肾 IRI 的病理生理过程中占有核心地位^[6]。HUANG 等^[7]认为, 炎症反应是 IRI 最为主要的特征之一。而剧烈的炎症反应导致急性肾小管坏死, 坏死后的小管碎屑作为一种危险信号在循环中进一步激发炎症反应, 使肾小管上皮细胞处于缺氧状态。因此, 针对急性肾损伤的早期抗炎治疗具有重要的价值^[8]。

Dex 是新一代 α 2AR 激动剂, 分布半衰期为约 5 min, 消除半衰期约 2 h, 不良反应相对轻且少。临床上主要作为手术麻醉辅助药和 ICU 镇静。此外, Dex 还具有镇痛、抑制交感兴奋、抗焦虑、稳定血流动力学和利尿效应^[9]。BILLINGS 等^[10]研究发现, Dex 可以维持小鼠肾髓质血流从而防止造影剂肾病发生。KOCOGLU 等^[2]在肾缺血再灌注损伤大鼠研究中发现, Dex 预处理可降低肾缺血再灌注损伤, 提高肾脏对缺血的耐受性。因此, 笔者推测, Dex 能够通过减轻肾损伤后炎症反应、阻止肾小管上皮细胞凋亡加剧从而降低缺血再灌注后肾损伤的程度。

本实验通过 HE 染色发现, 对照组小鼠肾组织结构形态正常, 而 IR 模型组出现不同程度的肾小管扩张、萎缩、空泡变性, 肾小管上皮细胞扁平、核染色缺失、炎症细胞浸润。但 Dex 组小鼠肾脏组织病理改变较 IR 模型组明显减轻。说明 Dex 本身对肾脏不会造成损伤, Dex 能够减轻 IR 后受损肾脏的病变程度, 从一定程度上维持肾脏结构与形态的稳定, 进而改善肾脏功能。

HIF-1 α 是迄今为止发现的唯一一个在缺氧状态下发挥活性的特异性转录因子, 是细胞低氧的可靠标记物, 是反映低氧状态的一个敏感指标^[10]。HAUCK 等^[11]认为, 缺氧导致细胞死亡的主要方式是通过诱导细胞凋亡来实现的。细胞内氧浓度对 HIF-1 α 的表达进行着精细的调节, 随着氧浓度的下降, 其表达增加。本研究发现, 对照组 HIF-1 α 表达较微弱, IR 模型组 HIF-1 α 大量表达, 而 Dex 组 HIF-1 α 较 IR 模型组表达显著减少。说明 Dex 能够减轻肾 IR 后受损肾小管上皮细胞低氧状态, 从而减

轻肾脏损害。

MCP1 是趋化因子 CC 亚家族中的一员,在正常情况下肾组织中仅有少量表达。然而,在病理状态下,MCP1 在肾小管间质中可广泛表达。刘雷等^[5]认为,MCP1 启动并放大炎症反应过程,在肾 IRI 中发挥重要作用。本实验通过研究发现,对照组 MCP1 表达较微弱,IR 模型组 MCP1 大量表达,而 Dex 组 MCP1 蛋白表达水平较 IR 模型组显著减少。说明 Dex 能够通过减轻 IR 后肾组织炎症反应,从而保护肾脏功能。从表 2 可以看出,Dex 组小鼠肾功能较 IR 模型组明显改善。

IR 的炎症反应始于缺血阶段,再灌注之后补体系统被激活,引发后天免疫系统的级联反应,促进炎症的发展^[6],炎症反应的发展可能会导致肾小管上皮细胞处于缺氧状态加剧。因此,针对 ARF/AKI 的早期抗炎治疗具有重要的价值。通过以上研究结果,笔者推测 Dex 参与肾脏 IRI 后的病理生理过程,主要通过下调 MCP1 和 HIF-1 α 的表达,从而减轻肾脏炎症反应,降低肾小管上皮细胞缺氧程度,进而保护肾脏功能。希望能够为临床早期防治 IR 后肾损伤及其他脏器损伤提供新的治疗思路。

参 考 文 献:

[1] BORTHWICK E, FERGUSON A. Perioperative acute kidney injury: risk factors, recognition, management and outcomes[J]. BMJ,

2010, 341: c3365.

- [2] KOCOGLU H, OZTURK H, OZTURK H, et al. Effect of dexmedetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney: a histopathologic study[J]. Ren Fail, 2009, 31(1): 70-74.
- [3] CAROLLO DS, NOSSAMAN BD, RAMADHYANI U. Dexmedetomidine: a review of clinical applications[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2008, 21(4): 457-461.
- [4] DJUDJAJ S, CHATZIANTONIOU C, RAFFETSEDER U, et al. Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury[J]. J Pathol, 2012, 228(3): 286-299.
- [5] 刘雷, 孟建中. 单核细胞趋化蛋白-1 对缺血再灌注肾损伤的影响机制[J]. 国际移植与血液净化杂志. 2007, 5(5): 18-20.
- [6] DAEMEN M A, DE VRIES B, BUURMAN W A. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury[J]. Transplantation, 2002, 73(11): 1693-1700.
- [7] HUANG Y, RABB H, WOMER K L. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses[J]. Cell Immunol, 2007, 248(1): 4-11.
- [8] THURMAN J M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion[J]. Clin Immunol, 2007, 123(1): 7-13.
- [9] BILLINGS F T, CHEN S W, KIM M, et al. Alpha2-adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice[J]. Am J Physiol, 2008, 295(3): 741-748.
- [10] STRAVODIMOS K G, KORITSIADIS G, LAZARIS A C, et al. Hydronephrosis promotes expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. Urol Int, 2009, 82(1): 38-42.
- [11] HAUCK I, HANSMANN, DIETZ R, et al. Inhibition of hypoxia-induced apoptosis by modulation of retinoblastoma protein-dependent signaling in cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2002, 91(9): 782-789.

(张蕾 编辑)