

右美托咪定对脓毒血症大鼠肾功能及 紧密连接蛋白表达的影响

李金洁¹, 康吉龙¹, 赵英², 赵颖³

(1. 延边大学临床学院, 延吉 吉林 133002; 2. 沈阳军区总医院心内科, 沈阳 辽宁 110016;
3. 吉林大学第一医院肾内科, 长春 吉林 130021)

【摘要】 目的 探讨右美托咪定对脓毒血症大鼠肾功能及紧密连接蛋白表达的影响。**方法** SD 大鼠 30 只, 随机分为右美托咪定处理组 (Dex 组)、脓毒血症模型组 (M 组)、生理盐水对照组 (C 组), 每组 10 只。Dex 组大鼠静脉注射脂多糖 (LPS) 5 mg/kg, 之后泵注 Dex 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 15 min 后调整剂量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{h}$, 持续泵注 30 min; 模型组按同样方法给予 LPS 后泵注生理盐水; C 组始终采用上述方法给予生理盐水。24 h 后取血液分离血浆, 多功能生化仪检测肌酐 (Scr) 和尿素氮 (BUN) 含量; ELISA 检测 IL-1 β 和 TNF- α 含量; Western blot 检测肾组织中紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达变化。**结果** 与 C 组相比, 模型组损伤较重, 可见大量炎性细胞浸润, 有肾小球肾炎表现, 而 Dex 组未见明显的炎症细胞, 细胞异常较少, 与模型组相比, 损伤减轻。肾功能及炎症因子检测结果显示, 与 C 组比较, 各组血浆中 Scr、BUN、IL-1 β 和 TNF- α 含量均显著升高 ($P < 0.05$), ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Dex 组各项指标均明显降低 ($P < 0.05$), ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$)。**结论** 右美托咪定可改善脓毒血症所致的急性肾损伤的肾功能, 抑制炎症反应, 提升紧密连接蛋白, 对肾脏有一定的保护作用。

【关键词】 右美托咪定; 脓毒血症; 肾功能; 紧密连接蛋白

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 04-0014-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.04.003

Effect of dexmedetomidine on the renal function and expression of tight junction protein ZO-1 and occludin in the kidney of rats with septicopyemia

Li Jin-jie¹, Kang Ji-long¹, Zhao Ying², Zhao Ying³

(1. Yanbian University, Yanbian, Jilin 133002, China; 2. Shenyang Military General Hospital of Shenyang District, Shenyang 110016; 3. the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of dexmedetomidine on the renal function and the expression of tight junction protein ZO-1 and occluding in the kidney of rats with septicopyemia induced by lipopolysaccharide. **Methods** Thirty adult male SD rats were randomly divided into 3 groups ($n = 10$ each): control group (group C), LPS group (group M), and dexmedetomidine group (group Dex). In the groups Dex and LPS, the rats were infused with saline and lipopolysaccharide (5 mg/kg, i. v.) respectively. In the Dex group, after intravenous injection of lipopolysaccharide (5 mg/kg), the rats were firstly infused the loaded dose of dexmedetomidine (7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for 15 minutes, and then changed to

[作者简介] 李金洁 (1994 -), 女, 主要研究方向: 麻醉学, E-mail: lijinnie1994@163.com。

[通讯作者] 康吉龙, 1961 年 12 月, 硕士, 主任医师, 麻醉科副主任, 麻醉学专业, E-mail: 15526770722@163.com。

5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ for 30 minutes. Blood samples were collected at 24 h later for measuring TNF- α , IL-1 β , Scr and BUN. The kidney tissues were examined by histopathology. The expression of ZO-1 and occludin was detected by Western blot.

Results Compared with the group C, the kidney tissue of group M was extensively damaged with tubular dilatation and inflammation, while reduced in the group Dex. Compared with the group C, the expressions of Scr, BUN, IL-1 β and TNF- α were all enhanced in the groups M and Dex ($P < 0.05$), while the inflammatory factors in the group Dex were significantly lower than those of the group M ($P < 0.05$). The **Results** The Western blot analysis showed that the expressions of protein ZO-1 and occludin in the group Dex were significantly higher than those of the group M ($P < 0.05$).

Conclusions Dexmedetomidine can improve the renal function of rats with septicopyemia, inhibit the acute renal injury and inflammation, increase the expression of protein ZO-1, and exert certain protective effect on the kidneys.

【Key words】 Dexmedetomidine; Septicopyemia; Renal function; Occludin; ZO-1; Kidney; Rat

脓毒血症 (septicopyemia) 亦称脓毒症, 是指由微生物及其毒素等产物所引起的全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)^[1, 2]。临床中由脓毒血症引发的急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是 ICU 的一个严重医疗问题, 死亡率高达 70%^[3]。目前, 有关 AKI 的防治尚缺少行之有效的技术和方法, 致使脓毒血症患者 AKI 的发病率和死亡率居高不下。研究表明右美托咪定 (dexmedetomidine, Dex) 属于 α_2 -肾上腺素能受体 (α_2 -AR) 激动剂, 具镇静、镇痛和稳定循环的作用, 且在缺血再灌注等多种手术方法中对心、脑、肾、肺等重要脏器还有保护作用^[4], 但其潜在的分子机制仍不清楚。本研究建立脓毒血症大鼠模型, 同时给予 Dex 干预, 对比观察大鼠血浆中肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、白介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的含量变化以及肾组织中紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达变化, 旨在观察 Dex 对脓毒血症大鼠急性肾损伤的保护作用, 初步探讨其作用机制, 为临床防治脓毒血症损伤提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选取健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 220 ~ 280 g, 由延边大学实验动物室提供, 严格按照延边大学实验动物管理办法进行实验, 动物生产许可证号【SCXK(吉)2011-0009】; 使用许可证号【SYXK(吉)2011-0007】。将大鼠随机分为右美托咪定后处理组 (Dex 组)、脓毒血症模型组 (M 组)、生理盐水对照组 (C 组), 每组 10 只。

1.2 脓毒血症大鼠模型的建立

各组大鼠于造模前禁食水 6 h, 腹腔注射 10% 水合氯醛行麻醉处理, 仰卧位固定; Dex 组大鼠静脉

注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (LPS from *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma, L2630) 5 mg/kg, 之后泵注 Dex 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 15 min 后调整剂量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{h}$, 持续泵注 30 min; 模型组按同样方法给予 LPS 后泵注生理盐水; C 组始终采用上述方法给予生理盐水。

1.3 样本采集与检测

各组于 LPS 注入 24 h 后, 水合氯醛麻醉, 股动脉放血处死, 取血液分离血浆, 一部分送检验科用检测肌酐 (Scr) 和尿素氮 (BUN) 含量, 另一部分用 ELISA 试剂盒 (美国 R&D) 检测血浆中 IL-1 β 和 TNF- α 含量; 取一侧肾组织, 一部分固定于福尔马林中, 常规石蜡包埋切片, HE 染色观察肾脏组织学变化; 另一部分肾脏加 RIPA 裂解液, 冰上超声裂解, 用 Western blot 法检测肾脏中 ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

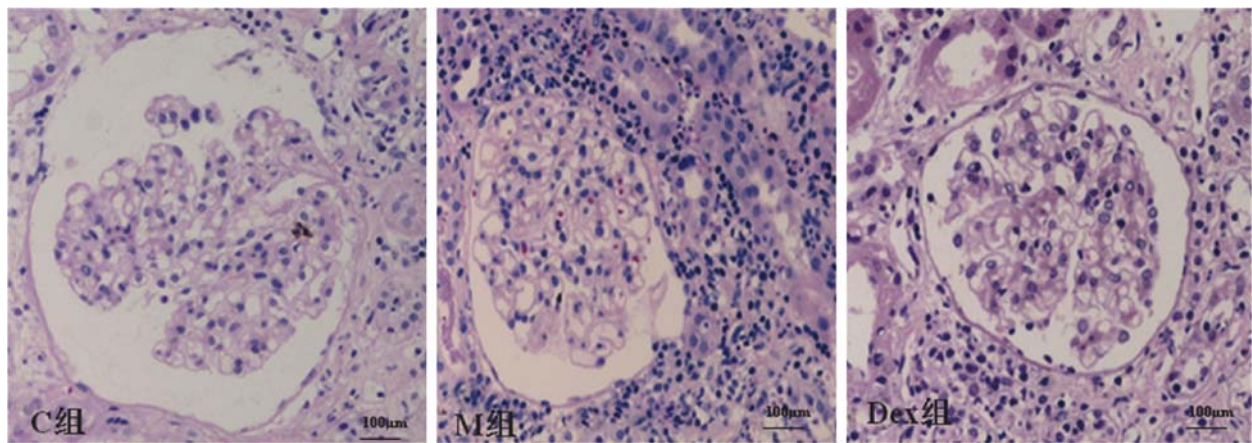
2 结果

2.1 肾脏病理组织学变化

C 组肾脏未见明显病理组织学变化, 与其相比, 模型组肾脏损伤较重, 可见大量炎性细胞浸润, 有肾小球肾炎表现; 而 Dex 组肾脏未见明显的炎症细胞, 细胞异常较少, 与模型组相比, 损伤减轻 (图 1)。

2.2 各组肾功能检测结果

血浆肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 检测结果如表 1 所示, 与 C 组相比, Dex 组和模型组中 Scr 和 BUN 含量显著升高 ($P < 0.05$); 但 Dex 组中 Scr 和 BUN 含量显著低于模型组 ($P < 0.05$)。



注: C 组对照组, 注射生理盐水; M 组模型组, 注射 LPS; Dex 组给予 LPS 后注射右美托咪定

图 1 肾脏 HE 染色结果 ×200 (标尺 = 100μm)

Note. C: Control group, saline; M: Model group, injected LPS;
Dex: The rats in the Dex group were given dexmedetomidine after LPS injection

Fig. 1 Histological changes of the rat kidneys. HE staining, ×200 (Bar = 100 μm)

表 1 肾功能检测结果

Tab. 1 Results of renal function tests

组别 Groups	肌酐 (μmol/L) Scr (μmol/L)	尿素氮 (mmol/L) BUN (mmol/L)
C 组 Group C	40. 21 ± 6. 31	6. 01 ± 0. 41
模型组 Group M	130. 34 ± 11. 39 *	28. 56 ± 4. 34 *
Dex 组 Group Dex	80. 29 ± 10. 12 * △	19. 15 ± 5. 08 * △

注: 与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$
Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; △ $P < 0.05$, compared with the model group.

2.3 各组炎症因子检测结果

各组炎症因子检测结果如表 2 所示, 与 C 组相比, Dex 组和模型组中 IL-1β 和 TNF-α 含量显著升高 ($P < 0.05$); 但 Dex 组中 IL-1β 和 TNF-α 含量显著低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 2 炎症因子检测结果

Tab. 2 Results of detection of inflammatory cytokines

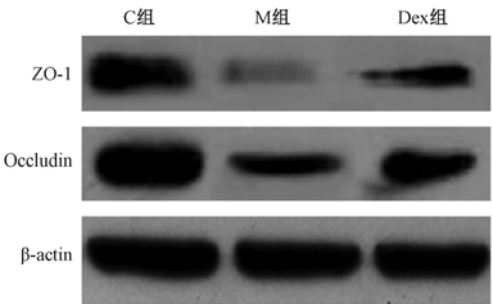
组别 Groups	白介素-1β IL-1β (ng/L)	肿瘤坏死因子 α TNF-α (ng/L)
C 组 Group C	73. 56 ± 12. 15	63. 17 ± 12. 13
模型组 Group M	165. 34 ± 21. 17 *	147. 59 ± 22. 38 *
Dex 组 Group Dex	112. 69 ± 17. 81 * △	97. 69 ± 16. 28 * △

注: 与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$

2.4 ZO-1 和 Occludin 的表达

与 C 组比较, 各实验组 ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, Dex 组

ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$), 见图 2 和表 3。



注: C 组对照组, 注射生理盐水; M 组模型组, 注射 LPS;
Dex 组给予 LPS 后注射右美托咪定

图 2 各组肾脏 ZO-1 和 occludin 表达检测

Note. C: Control group, saline; M: Model group, injected with LPS;
Dex: Group Dex was given dexmedetomidine after LPS injection.

Fig. 2 The expression of ZO-1 and occludin in each group

表 3 各组大鼠肾组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The expressions of ZO-1 and occludin in each group

组别 Groups	ZO-1	Occludin
C 组 Group C	0. 66 ± 0. 10	0. 85 ± 0. 11
模型组 Group M	0. 21 ± 0. 04 *	0. 36 ± 0. 05 *
Dex 组 Group Dex	0. 48 ± 0. 06 * △	0. 64 ± 0. 06 * △

注: 与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$
Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; △ $P < 0.05$, compared with the model group.

3 讨论

脓毒血症是由多种感染因素诱发引起的剧烈的全身炎症反应综合征,是一种全身化脓性疾病。脓毒血症病情较为凶险,可引起多种脏器的损伤,病死率极高,对人类健康造成了巨大威胁。在各类脏器损伤中,肾脏的损伤十分常见^[5,6]。本实验参考文献^[7],将 LPS 注射大鼠建立脓毒血症模型,大鼠 24 h 后死亡率高,IL-1 β 和 TNF- α 炎症因子表达增强,心脏、肺脏、肠、肾脏等器官均有不同程度损伤,可见本实验成功建立脓毒血症大鼠模型。目前研究表明,由脓毒血症引发急性肾损伤(AKI)的主要机制是肾脏的自身调节出现障碍,使肾脏出现“压力灌注—流量灌注分离”现象;而炎症反应和多聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)过度活化也参与了 AKI 的发病^[5,8,9]。寻找能够抑制炎症反应和调节肾灌注的措施对于降低感染性休克致 AKI 的发生具有重要意义。

Dex 可通过抑制去甲肾上腺素的释放,调节交感神经张力和肾血管阻力并抑制血管加压素分泌,改善肾血流、增加肾小球滤过率和产生利尿作用,从而保护了肾组织细胞和肾功能^[10]。Dahmani 等^[11]研究结果显示,Dex 可通过改善肾脏外层髓质血流而降低造影剂导致小鼠的肾脏损伤。此外,Dex 还可激动肾小管上皮细胞的 α_2 AR 受体,而抑制抗利尿激素的释放,增加利钠多肽释放和肾小球滤过,同时降低循环血浆 NE 水平,使肾脏血管扩张、血流量增加,从而达到肾脏的保护作用^[12]。临床上通常采用 BUN 和 Scr 来评估患者肾功能,BUN 和 Scr 值在正常范围内表明肾脏可以排出体内废物,维持内环境稳定,当肾脏发生损伤时,这两个指标会出现异常。本研究在建立脓毒血症大鼠模型的基础上给予 Dex 干预,从病理组织学和血浆中 BUN 和 Scr 指标变化来评估肾功能,结果模型组肾脏损伤较重,Dex 干预后异常细胞明显减少,在一定程度上减轻 LPS 致大鼠近端和远端小管超微结构的改变,且 BUN 和 Scr 浓度明显降低。提示 Dex 对脓毒血症大鼠肾功能有一定的保护作用。

脓毒血症上皮细胞是细胞因子作用的靶点,LPS 可致管周毛细血管功能障碍及肾小管上皮细胞损伤。有研究显示,Dex 可通过抑制脱乙酰基酶组蛋白 HDAC2 和 HDAC5 表达,从而减少促炎细胞因子,降低炎症反应,而提高脓毒血症大鼠的生存

率^[13]。持续输注 Dex 可减轻肾缺血/再灌注(I/R)损伤,提高对肾损伤的耐受性^[14,15]。本研究表明,Dex 可减轻 LPS 所致血清炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平的升高,提示 Dex 对脓毒症诱发的炎症反应有一定的抑制作用。

紧密连接在肾发育过程—肾单位形成中发挥重要的作用。研究表明,在缺血性损伤、自由基损伤及 ATP 缺失的情况下,各种组织的紧密连接蛋白断裂,表达发生改变,且紧密连接蛋白调控肾小管细胞旁通透性。ZO-1 作为紧密连接的组织者,可介导信号转导和蛋白间的相互作用;Occludin 与其对细胞膜的调节有关,可增加其对低分子量分子的细胞旁通透性^[16,17]。本研究结果表明,脓毒血症大鼠肾组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达明显下降,而一定剂量的 Dex 在一定程度上可上调由脓毒血症致大鼠肾组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达。

综上所述,Dex 可减轻脓毒血症引起的肾组织炎症反应,改善肾功能,且上调肾组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 蛋白的表达,上调肾组织紧密连接蛋白表达可能是其发挥的保护作用的机制之一。

参考文献:

- [1] Zullo JA, Fan J, Azar TT, et al. Exocytosis of endothelial lysosome-related organelles hair-Triggers a patchy loss of glycocalyx at the onset of sepsis[J]. Am J Pathol, 2016,186(2):248-258
- [2] 李鸿,贾丙申. 激素合并内毒素诱导大鼠股骨头坏死扫描电镜观察[J]. 中国比较医学杂志,2007,(05):256-258.
- [3] Wong DM, Wilkins PA. Defining the systemic inflammatory response syndrome in equine neonates[J]. Vet Clin North Am Equine Pract. 2015,31(3):463-481.
- [4] Li Y, He R, Chen S, et al. Effect of dexmedetomidine on early postoperative cognitive dysfunction and peri-operative inflammation in elderly patients undergoing laparoscopic cholecystectomy[J]. Exp Ther Med,2015,10(5):1635-1642.
- [5] 王春雨,凡春玲,罗晓红,等. 内毒素致多脏器功能障碍综合征绵羊模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2011,(08):49-52.
- [6] 王喆,郭广进,熊敏,等. 急性低压缺氧对大鼠肾组织中生化指标变化的研究[J]. 中国比较医学杂志,2014,(03):30-33.
- [7] 孟建中,郭爱华,李丹丹,等. 盐酸法舒地尔防治脓毒血症大鼠急性肾损伤的实验研究[J]. 生物医学工程研究,2010,(03):197-201.

- SAMHD1 is required for HIV - 1 restriction [J]. Nat Med, 2014, 20(8): 936 - 941.
- [3] Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, et al. Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one-versus two-enzyme systems [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000, 16(13): 1247 - 1257.
- [4] Zhang R, Bloch N, Nguyen LA, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 replication and regulates inter-feron production in mouse myeloid cells [J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): 1 - 10.
- [5] Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic and myeloid - cell - specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx [J]. Nature, 2011, 474 (7353): 654 - 657.
- [6] Ballana I E, Esté JA. SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction [J]. Trends Microbiol, 2015, 23(11): 680 - 692.
- [7] Gao WY, Cara A, Gallo RC, et al. Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(19): 8925 - 8928.
- [8] Wu L. SAMHD1: a new contributor to HIV-1 restriction in resting CD4⁺ T-cells [J]. Retrovirology, 2012, 23(9): 88.
- [9] Goncalves A, Kavayel E, Rice GI, et al. SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to Aicardi-Goutieres syndrome-associated mutations [J]. Hum Mutat, 2012, 33(7): 1116 - 1122.
- [10] Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates [J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 223 - 228.
- [11] Baldauf HM, Pan X, Erikson E, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4⁺ T cells [J]. Nat Med, 2012, 18 (11): 1682 - 1687.
- [12] Ayinde D, Casartelli N, Schwartz O. Restricting HIV the SAMHD1 way: through nucleotide starvation [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(10): 675 - 680.

[修回日期] 2016-02-01

(上接第 17 页)

- [8] Cooper D S, Claes D, Goldstein S L, et al. Follow-Up renal assessment of injury long-term after acute kidney injury (FRAIL-AKI) [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(1): 21 - 29.
- [9] Clement J. Considerations about a Chinese vaccine preventing a national form of epidemic acute kidney injury (AKI) [J]. Infect Dis (Lond), 2015, 135(12): 1 - 3.
- [10] Sun Y, Gao Q, Wu N, et al. Protective effects of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(2): 647 - 652.
- [11] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, et al. Characterization of the postconditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation [J]. Anesthesiology, 2010, 112(2): 373 - 383.
- [12] Stoetzer C, Reuter S, Doll T, et al. Inhibition of the cardiac Na channel alpha-subunit Nav1.5 by propofol and dexmedetomidine [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2016, 389(3): 315 - 325.
- [13] Yao H, Chi X, Jin Y, et al. Dexmedetomidine Inhibits TLR4/NF-kappaB Activation and reduces acute kidney injury after orthotopic autologous liver transplantation in rats [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16849.
- [14] 陈克研, 张毅男, 刁玉刚, 周锦, 张铁铮. 右美托咪定抑制肾缺血/再灌注炎症反应 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(53): 9189 - 9195.
- [15] 李新灵, 雷钟, 杜靖, 等. 不同剂量右美托咪定对大鼠肾缺血再灌注后心肌组织损伤的影响 [J]. 医学研究生学报, 2015, (8): 809 - 814.
- [16] Miao Y S, Zhao Y Y, Zhao L N, et al. MiR-18a increased the permeability of BTB via RUNX1 mediated down-regulation of ZO-1, occludin and claudin-5 [J]. Cell Signal, 2015, 27(1): 156 - 167.
- [17] Cai H, Liu W, Xue Y, et al. Roundabout 4 regulates blood-tumor barrier permeability through the modulation of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 expression [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2015, 74(1): 25 - 37.

[修回日期] 2016-02-22

更 正

《中国比较医学杂志》2016 年 (26) 卷第 2 期首篇 (1 - 3 页) 文章: "浅谈实验动物微生物国家标准", 原作者为 "魏强, 秦川", 现作者更正为 "魏强"。特此更正。