



右美托咪定通过抑制 NLRP3 炎性体激活减轻高氧诱导的急性肺损伤

李 刚 喻红彪 任思宏

(南充市中心医院麻醉科,南充 637000)

摘要:目的 探讨右美托咪定减轻高氧诱导的急性肺损伤的效果及机制。方法 雄性 SD 大鼠 30 只随机分为 3 组,即对照组,模型组与右美托咪定组,每组各 10 只,模型组与右美托咪定组构建高氧肺损伤模型。右美托咪定组在造模同时注射右美托咪定,对照组与模型组注射等量生理盐水。造模 1 周后取出肺部组织测定其干湿重比例。应用 ELISA 法检测大鼠血清中的 IL-6、iNOS、VEGF 和 bFGF 蛋白表达量。应用 RT-PCR 法测定 IL-2 和 TNF α 表达量。应用免疫印迹 Western blot 法测定 NLRP3 和 Cav-1 蛋白表达量。结果 模型组肺组织干湿重比为 (4.82 ± 0.26) ,高于对照组 (2.29 ± 0.51) 和右美托咪定组 (3.11 ± 0.53) , $P < 0.05$ 。在造模 1 周以后,右美托咪定组平均呼吸频率为 (72.75 ± 6.74) 次/min,低于模型组 ($P < 0.05$),血清 VEGF 和 bFGF 水平分别为 (0.368 ± 0.079) ng/L 和 (24.85 ± 2.36) ng/L,高于模型组 ($P < 0.05$)。右美托咪定组 IL-6 和 iNOS 显著低于模型组, NLRP3 和 Cav-1 则显著高于模型组 ($P < 0.05$)。结论 右美托咪定可以抑制 NLRP3 炎性体激活减轻高氧诱导的急性肺损伤。

关键词:右美托咪定;NLRP3 炎性体;高氧性;肺损伤

中图分类号: R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0048-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.009

高浓度的氧对严重的呼吸衰竭有良好的治疗作用,一般在重症监护室应用较多^[1]。但是长时间地吸入高浓度的氧气却会造成肺损伤^[2]。高氧造成的肺损伤的原因主要是线粒体产生的活性氧,活性氧可活化炎症细胞,以及释放炎症介质,引起肺组织结构的重建与上皮细胞死亡,是急性肺损伤的原因^[3]。右美托咪定是一种高选择性的肾上腺素受体激动剂^[1-2],近年来在临床上的使用已经越来越广泛。右美托咪定对血流动力学影响轻微^[3],已被广泛应用于外科手术。右美托咪定可以通过抑制凋亡和抗炎作用从而保护机体的大脑,肝脏,肠胃,心脏以及肺部组织^[4]。炎症小体是调节先天免疫的多蛋白复合物^[4],中枢神经系统中存在大量与脑损伤有关的炎症小体^[5]。目前国内外在众多的炎症小体的研究中,NLRP3 是研究的热点^[6]。炎症小体和肺损伤机制关联研究则相对较少。本研究探究右美托咪定对炎症小体 NLRP3 抑制作用以及肺损伤的恢复机制,为右美托咪定预防及治疗肺损伤方面提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取成年雄性 SD 大鼠 30 只,体质量为 (285.67 ± 8.3) g,购自中科院上海实验动物中心(实验动物合格证:SCXK 沪 2002-0010);盐酸右美托咪定购自江苏恩华药业(批号:20131768);兔源抗 β -actin 单克隆抗体来自碧云天公司;兔抗鼠 Cav-1 和 NLRP3 抗体均来自美国 CST 公司;基因的相关引物设计来自天津赛默飞公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及造模:将大鼠编号,随机分为空白对照、模型组及右美托咪定组,各组 10 只。各组大鼠新环境适应期 3 d,空白对照组呼吸正常室内空气,模型高氧组大鼠放置于密闭氧气环境内,舱内连接有输氧管和测氧仪,实验组高氧浓度为 100%,高氧呼吸时间为 1 周,期间不断检测氧气浓度。右美托咪定组大鼠在高氧舱内期间,尾静脉单次注射右美托咪定溶液,剂量为 $0.6 \mu\text{g/kg}$ 体质量,

注射时间 30 s。各组大鼠摄食饮水正常,饲养温度 23~25 ℃。

1.2.2 生化指标检测

1.2.2.1 大鼠呼吸频率检测:应用成都仪器厂生产的 DHX-150 动物呼吸机来监测大鼠呼吸频率,将各组 SD 大鼠麻醉以后,套上呼吸机,潮气量:4 mL/100 g,呼吸比:1:1 参数下检测大鼠呼吸次数,记录对比。

1.2.2.2 大鼠血清中 IL-6、iNOS 等含量检测:完成呼吸频率监测后 1 h 取大鼠尾静脉外周血 5 mL。应用酶联免疫 ELISA 法监测血清中的可溶性 IL-6、iNOS 等含量,将抗凝剂加入到提前准备好的洁净试

管中以后,于 1 000 r/min 离心,20 min,4℃ 条件下收取血清,在超低温下冷冻保存。解冻以后使用试剂盒测定其浓度。绘制标准曲线,测定值代入标准曲线,计算各组的血清中 IL-6、iNOS 浓度。

1.2.2.3 大鼠肺组织干湿重比例测定:SD 大鼠在高氧仓饲养 1 周后,麻醉处死大鼠,取其肺部组织,精准称量右肺组织湿重,称量之后立即放入到 100 ℃ 的烘箱中,鼓风干燥 48 h 后称量质量,所称得为组织干重。肺组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.2.4 大鼠基因引物设计:IL-2, TNFα 以及 β-actin 引物设计见表 1。

表 1 RT-PCR 过程中引物序列 (n=16)
Table 1 Primer sequences in RT-PCR (n=16)

基因名称	上游	下游	长度 (bp)
IL-2	CGCTAGCTCGATGCTGCATCA	CGATGCTACGCTTAGCGTATG	136
TNFα	CATGAGCGCTGAAGTGCTGA	CGATCGATAATGGTGAGACC	149
β-actin	CGATAGTTGGCACGTCGTGG	GTACTCGAGTGCGCATGACA	121

1.2.2.5 RT-PCR 法测定 SD 大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 表达量:使用软件设计小鼠 β-actin, TNF-α 和 IL-2 上下游引物序列,选取长度小于 150 bp 的片段。RNA 的提取:将各组 60 mg 的肺部组织置入离心管以后,加入 Trizol 试剂,研磨后离心取上清,后加入氯仿继续离心取上清,加入异丙醇,吸取上清取沉淀,后用 DEPC 水溶解,于 PCR 扩增仪中扩增。上样:将 50× 的 TAE 稀释为 1× TAE 溶液作为溶剂,称取 0.52 g 琼脂糖,加入到 1×TAE 溶液当中,之后微波炉加热煮沸,后加入 4 μL 的核酸染料,摇晃混匀。最后将琼脂糖凝胶水平放入电泳槽,依次加入 6 μL 的 DNA Marker 以及目的基因 PCR 扩增产物。

1.2.2.6 Western Blot 法测定大鼠 IL-2、TNFα、NLRP3 和 Cav-1 蛋白含量:取各组大鼠左肺组织 60 mg,剪碎后置到离心管中,加 RIPA 裂解液和 PMSF 研磨 1 min,后离心 15 min 取上清。用考马斯法检测各管吸光值,将各组蛋白调至同样浓度后进行蛋白上样。把 NC 膜放入到平皿后在容器中添加脱脂奶粉并在摇床上暗处封闭 0.5~1.5 h。弃去奶粉后取出 NC 膜置于 TBST 中冲洗 3 次以后加入兔抗鼠 Cav-1, β-actin 和 NLRP3 抗体,4 ℃ 下孵育过夜。第 2 天取出 NC 膜,于 TBST 溶液中洗涤 4 次后加入 2 抗孵育,发光液 a 液和 b 液按 1:1 的比例现用现配,由左至右缓慢滴加到膜上,转移到暗室进行胶片冲洗。

1.3 统计方法

应用 SPSS 20.0 软件统计分析,计量数据用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,方差齐性检验后,组间比较应用 LSD 检验,用 Pearson Correlation 进行相关性检验,检验水准 $\alpha=0.05$;计数资料比较应用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织干湿重比和呼吸频率

造模前,各组大鼠呼吸频率比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);造模后,与对照组比较,模型组和右美托咪定组大鼠呼吸频率显著降低;与模型组比较,右美托咪定组大鼠呼吸频率显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组比较,模型组肺组织干湿重比例显著升高;与模型组比较,右美托咪定组肺组织干湿重比例显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

2.2 血清 VEGF 和 bFGF 含量结果比较

在造模 1 周后,与对照组比较,模型组和右美托咪定组血清中 VEGF 和 bFGF 水平显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与模型组比较,右美托咪定组血清中 VEGF 和 bFGF 水平显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3。

表 2 各组大鼠肺组织干湿重和呼吸频率结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Results of dry and wet weight and respiratory rate of lung tissue in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	例数	造模前呼吸频率/(次/min)	造模后呼吸频率/(次/min)	肺组织干湿重比例/(W/D)
对照组	10	85.34±3.56	86.50±4.50	2.29±0.51
模型组	10	83.00±2.57	54.50±5.76*	4.82±0.26*
右美托咪定组	10	87.53±5.00	72.75±6.74* [#]	3.11±0.53 [#]

注:与对照组相比较,* $P<0.05$;与模型组相比较,[#] $P<0.05$

Note: compared with the control group,* $P<0.05$; compared with the model group,[#] $P<0.05$

表 3 各组大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 含量比较($n=16$)

Table 3 Comparison of serum VEGF and bFGF levels in each group of rats ($n=16$)

组别	VEGF/(ng/L)	bFGF/(ng/L)
对照组	0.491±0.011	27.17±1.19
模型组	0.126±0.014*	12.28±1.26*
右美托咪定组	0.368±0.079* [#]	24.85±2.36* [#]

注:与对照组相比较,* $P<0.05$;与模型组相比较,[#] $P<0.05$

Note: compared with the control group,* $P<0.05$; compared with the model group,[#] $P<0.05$

2.3 血清 IL-6 和 iNOS 蛋白含量比较

在造模 1 周以后,与对照组比较,模型组和右美托咪定组 IL-6 和 iNOS 水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,右美托咪定组 IL-6 和 iNOS 水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 IL-6 和 iNOS 含量比较($n=16$)

Table 4 Comparison of serum IL-6 and iNOS ($n=16$)

组别	IL-6/ $\mu\text{g/mL}$	iNOS/ $\mu\text{g/mL}$
对照组	2.01±0.32	2.25±0.94
模型组	4.46±0.53*	6.03±0.98*
右美托咪定组	2.89±0.73* [#]	3.68±1.27* [#]

注:与对照组相比较,* $P<0.05$;与模型组相比较,[#] $P<0.05$

Note: compared with the control group,* $P<0.05$; compared with the model group,[#] $P<0.05$

2.4 IL-2 和 TNF α 表达情况

RT-PCR 结果显示,与对照组比较,模型组 IL-2 和 TNF α 的表达量显著升高($P<0.05$)。右美托咪定组的 IL-2 和 TNF α 表达量与模型组相比降低,与对照组相比略有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5,图 1。

表 5 各组大鼠 IL-2 和 TNF α 表达量比较($n=16$)

Table 5 Comparison of IL-2 and TNF α expression($n=16$)

组别	IL-2(灰度值)	TNF α (灰度值)
对照组	2.25±0.49	4.13±0.25
模型组	6.26±0.75*	7.36±0.97 [#]
右美托咪定组	3.99±0.75	5.47±0.37

注:与对照组相比较,* $P<0.05$;与模型组相比较,[#] $P<0.05$

Note: compared with the control group,* $P<0.05$; compared with the model group,[#] $P<0.05$



图 1 RT-PCR 检测 IL-2 和 TNF α 表达情况

Fig.1 RT-PCR detection of IL-2 and TNF α expression

2.5 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达情况

蛋白质免疫印记检测结果显示,与对照组比较,模型组和右美托咪定组的 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达量显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,右美托咪定组 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 6,图 2。

表 6 各组大鼠 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达量比较($n=16$)

Table 6 Comparison of NLPR3 and Cav-1 protein expression ($n=16$)

组别	NLPR3(灰度值)	Cav-1(灰度值)
对照组	0.23±0.02	0.43±0.08
模型组	0.98±0.11*	0.99±0.12*
右美托咪定组	0.72±0.19* [#]	0.65±0.09* [#]

注:与对照组相比较,* $P<0.05$;与模型组相比较,[#] $P<0.05$

Note: compared with the control group,* $P<0.05$; compared with the model group,[#] $P<0.05$



图 2 Western Blot 检测 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达情况

Fig.2 Western Blot detection of NLPR3 and Cav-1 protein expression

3 讨论

急性肺损伤指的是直接或者间接因素引起的肺泡及毛细血管细胞的损伤^[7-8],导致肺部间质水肿以及急性呼吸功能不全,呼吸窘迫。由高氧引起的

急性肺损伤案例目前已有报道^[9],一方面氧气量的保障对不能自主呼吸的病人十分重要,另一方面长时间的吸入高纯度的氧又会造成肺损伤,所以寻求合适的方式治疗或预防由高氧引起的急性肺损伤十分重要。

VEGF 和 bFGF 在血管生成作用中占有重要的位置,可改善组织的缺氧状态,研究表明血清中 VEGF 和 bFGF 的含量与肺损伤严重程度相关^[10-11]。本研究显示,大鼠在高氧仓饲养 1 周造模以后,模型组和右美托咪定组血清中 VEGF 和 bFGF 含量整体变低。右美托咪定组 SD 大鼠 VEGF 和 bFGF 含量与正常相比略有变化,与模型组相比恢复明显。此外,SD 大鼠在实验期间肺组织的干湿重比例结果显示,模型组的肺组织干湿重比明显高于空白对照组和右美托咪定组,呼吸也变缓慢甚至衰竭,当给药以后各项指标均大幅恢复接近空白对照组,此结果初步探讨了右美托咪定对肺损伤的恢复作用。综合以往研究结果显示^[3,6],右美托咪定对大鼠呼吸频率及其它指标恢复更显著,但其作用机制尚不明确。

白介素的表达量会直接引起炎症反应^[12-13]。本实验结果显示,在构建高氧模型以后,血清中的 IL-6 和 IL-2 表达量升高,高于空白对照组,经过右美托咪定干预后,IL-2 和 IL-6 表达量降低,接近正常水平,结果显示,右美托咪定可以降低肺损伤,减少白介素的过度表达。TNF- α 是肿瘤坏死因子,肿瘤坏死因子是炎症反应过程中直接相关的炎症因子^[14]。报道显示,TNF- α 的表达量升高直接反应机体炎症程度。本实验结果显示,在构建高氧模型以后,模型组的 TNF- α 的表达量明显高于空白对照组,但是经过右美托咪定干预后,TNF- α 表达量降低,肺损伤程度也对应降低,提示右美托咪定对急性肺损伤的治疗可能与炎症因子调控相关。

NLRP3 是细胞凋亡的重要蛋白^[15-16],本研究发现,建模以后,NLRP3 的蛋白表达量明显升高,注射右美托咪定之后,NLRP3 蛋白表达量降低,此结果验证右美托咪定阻遏高氧引起的急性肺部损伤有 NLRP3 的参与。Cav-1 是重要的结构与调节蛋白,会参与到各组通路信号的转导当中,调节细胞的跨膜和转运,研究表明,Cav-1 所在通路的激活会调控炎症因子的表达,使肺损伤加重^[17]。本实验结果显示,模型组 Cav-1 的蛋白表达量与空白对照组相比呈升高趋势,进一步提示右美托咪定可以通过降低 Cav-1 蛋白表达量来缓解急性肺损伤。本研究显

示,右美托咪定可降低由高氧引起的肺损伤导致的呼吸频率降低,肺组织干湿重比例变大。此外,右美托咪定还可以降低血清中的白介素 IL-6, iNOS, VEGF 和 bFGF 的表达,同时下调 IL-2 和 TNF- α 等促炎因子的表达水平。蛋白表达检测结果显示,右美托咪定可降低 NLRP3 和 Cav-1 蛋白的表达量,因此我们认为右美托咪定治疗急性肺损伤可以通过下调 NLRP3 炎症小体,激活 Cav-1 所在通路,进而实现肺高氧损伤保护。既往相关机制研究主要集中于 TLR 通路调控,本研究为右美托咪定肺部保护机制提供了新的方向。

综上,右美托咪定可通过抑制 NLRP3 的异常表达,减少下游关键蛋白 Cav-1 等的表达,抑制重要的炎症相关因子 IL-2, IL-6, TNF- α 等炎症因子的表达,缓解急性肺损伤。

参 考 文 献

- [1] Girgin N K. Dexmedetomidine sedation for the treatment of tetanus in the intensive care unit[J]. Br J Anaesth, 2017, **99** (4): 599-600.
- [2] Wang X W. Effect of perioperative dexmedetomidine on the endocrine modulators of stress response: a meta-analysis[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015, **42**(8): 828-836.
- [3] Miya K. Efficacy of concomitant use of dexmedetomidine and propofol in tetanus[J]. Am J Emerg Med, 2015, **33**(12): 1848.e3-4.
- [4] Shang J, Yamashita T, Zhai Y, *et al.* Acceleration of NLRP3 inflammasome by chronic cerebral hypoperfusion in Alzheimer's disease model mouse[J]. Neuroscience Research, 2018, pii: S0168-0102(18)30202-5.
- [5] Chen A, Xu Y, Yuan J. Ginkgolide B ameliorates NLRP3 inflammasome activation after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal male rat [J]. Intern J Neurosci, 2018, **69** (2): 106-111.
- [6] Xu X, Yin D, Ren H, *et al.* Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury [J]. Neurobiol Dis, 2018, **117**(15): 15-27.
- [7] Badshah H, Ali T, Kim M O. Osmotin attenuates LPS induced neuro inflammation and memory impairments via the TLR4/ NFkappaB signaling pathway [J]. Sci Rep, 2016, **6** (13): 24493.
- [8] Mukherjee R, Wen L, Zhang X, *et al.* A novel digital method to assess air space loss associated with acute lung injury in experimental acute pancreatitis [J]. Pancreatology, 2018, **18** (5): 513-515.
- [9] Huang Z, Liu H, Zhang X, *et al.* Transcriptomic analysis of lung

- tissues after hUC-MSCs and FTY720 treatment of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mouse models [J]. *Intern Immunopharm*, 2018, **63**: 26-34.
- [10] Szubert S, Moszynski R, Michalak S, *et al.* The associations between serum VEGF, bFGF and endoglin levels with microvessel density and expression of proangiogenic factors in malignant and benign ovarian tumors [J]. *Microvascular Res*, 2016, **107**(1): 91-96.
- [11] Wang X H, Long Z W. Correlations of EGF G1380A, bFGF C754G and VEGF T460C polymorphisms with malignant melanoma susceptibility and prognosis: A case-control study[J]. *Gene*, 2017, **617**(1): 44-53.
- [12] Barış S, Akyürek O, Dursun A, *et al.* The impact of the IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-6 and IL-10 gene polymorphisms on the development of Behcet's disease and their association with the phenotype[J]. *Medicina Clínica*, 2016, **146**(9): 379-383.
- [13] Fan M F, Low J S, Tanimine N, *et al.* Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs [J]. *Cell Rep*, 2018, **25**(5): 1204-1213.
- [14] Fang T, Di Y, Li G, *et al.* Effects of telmisartan on TNF- α induced PPAR- γ phosphorylation and insulin resistance in adipocytes[J]. *Biochem Biophys Res Communications*, 2018, **503**(4): 3044-3049.
- [15] He Q, Li Z, Wang Y, *et al.* Resveratrol alleviates cerebral ischemia reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, **50**: 208-215.
- [16] Yu C, He Q, Zheng J, *et al.* Sulforaphane improves outcomes and slows cerebral ischemic/reperfusion injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, **45**: 74-78.
- [17] Wang D X, Pan Y Q, Liu B, *et al.* Cav-1 promotes atherosclerosis by activating JNK-associated signaling [J]. *Biochem Biophys Res Communications*, 2018, **503**(2): 513-520.

Dexmetomidine Reduces Hyperoxic Induction by Inhibiting NLRP3 Inflammatory Activation

LI Gang, YU Hongbiao, REN Sihong

(Department of Anesthesiology, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of dexmedetomidine on hyperoxia-induced acute lung injury. **Method** Thirty male SD rats were randomly divided into blank control group, model group and dexmedetomidine group, and the hyperoxic lung injury model was constructed. The dexmedetomidine group was injected with dexmedetomidine daily while the control group and model group were injected with saline. The dry-wet weight proportion of lung tissue was measured. The expression levels of IL-6, iNOS, VEGF and bFGF in serum of rats were detected by ELISA. The expression levels of IL-2 and TNF were detected using semi-quantitative PCR. The Western blot was used to determine the protein expression of NLRP3 and Cav-1. **Result** The dry-wet weight proportion of lung tissue in the model group was (4.82 $\pm$ 0.26), which was higher than that of the blank control group (2.29 $\pm$ 0.51) and dexmedetomidine group (3.11 $\pm$ 0.53), $P < 0.05$. After 1 week of modeling, the mean respiratory rate of the dexmedetomidine group was (72.75 $\pm$ 6.74)/min, which was lower than that of model group ($P < 0.05$), and serum VEGF and bFGF levels were (0.368 $\pm$ 0.079) ng/L and (24.85 $\pm$ 2.36) ng/L, higher than those in model group ($P < 0.05$). The levels of IL-6 and iNOS in the dexmedetomidine group were significantly lower than those in the model group, and NLRP3 and Cav-1 were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine can inhibit NLRP3 inflammatory activation and alleviate acute lung injury induced by high oxygen.

Key words: Dexmedetomidine; NLRP3 inflammatory body; hyperoxia; lung injury