

周瑜,贾静,王璐,等. 基于 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬探讨右美托咪定抗肠缺血再灌注的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 40-48.

Zhou Y, Jia J, Wang L, et al. Effect of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury based on miR-146a/Sirt6 signaling-mediated autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 40-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.006

基于 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬探讨右美托咪定 抗肠缺血再灌注的作用

周 瑜*, 贾 静, 王 璐, 周 敏

(西南医科大学附属医院麻醉科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬在右美托咪定 (DEX) 抗肠缺血再灌注 (I/R) 损伤中的作用。方法 将 SD 大鼠随机分配到 3 组, 包括假手术组 (Sham)、I/R 组和 DEX 组, 每组 8 只大鼠。除 Sham 组外, 其余组建立肠道 I/R 模型。DEX 组大鼠在缺血前 30 min 通过腹腔注射 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DEX 进行药物治疗。体内进行肠道组织病理学检查和评分。在体外实验中, 大鼠小肠隐窝上皮细胞 (IEC-6 细胞) 在氧-葡萄糖剥夺/复氧 (OGD/R) 处理之前与 DEX 一起孵育。采用 MTT 法分析 IEC-6 细胞活力。分别采用 TUNEL 法和实时定量 PCR 检测肠道、IEC-6 细胞中的凋亡情况和 miR-146a 水平。采用蛋白质印迹法和免疫荧光检测肠道、IEC-6 细胞中 Sirt6、LC3 水平。结果 组织病理学分析表明 DEX 处理对 I/R 诱导的肠上皮损伤具有保护作用, 并以剂量依赖性方式恢复 OGD/R 暴露后细胞增殖。与 I/R 组相比, DEX 组大鼠肠道组织中细胞凋亡显著减少 ($P < 0.01$), miR-146a、Sirt6 和 LC3 II 表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。与体内结果一致, 体外研究发现 DEX 显著减轻 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞凋亡 ($P < 0.01$), 同时显著增加了 IEC-6 细胞中 miR-146a、Sirt6 和 LC3 II 表达 ($P < 0.01$)。此外, 在 IEC-6 细胞中进行的 miR-146a 抑制剂实验, 并发现 miR-146a 抑制剂削弱 DEX 诱导的改善作用, 还通过下调 Sirt6 表达抑制自噬激活。结论 DEX 通过调节 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬显示出对 I/R 损伤具有保护作用。

【关键词】 miR-146a; Sirt6; 自噬; 大鼠; 右美托咪定; 肠缺血再灌注

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0040-09

Effect of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury based on miR-146a/Sirt6 signaling-mediated autophagy

ZHOU Yu*, JIA Jing, WANG Lu, ZHOU Min

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of miR-146a/Sirt6 signaling-mediated autophagy in dexmedetomidine (DEX) treatment of intestinal ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** SD rats were randomly assigned to Sham, I/R, and DEX groups with eight rats in each group. Except for the Sham group, the other groups underwent intestinal I/R modeling. Rats in the DEX group were treated by an intraperitoneal injection of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DEX at 30 min before ischemia. *In vivo*, intestinal histopathological examination and scoring were performed. *In vitro* experiments, the rat small intestinal crypt epithelial cell line IEC-6 was treated with DEX before deprivation/reoxygenation (OGD/R)

【基金项目】 四川省医学科研基金立项项目 (20190057)。

【作者简介】 周瑜 (1985—), 男, 硕士, 研究方向: 麻醉。E-mail: jimy120@163.com

treatment. IEC-6 cell viability was analyzed by MTT assays. Apoptosis and miR-146a expression in intestines and IEC-6 cells were detected by TUNEL and quantitative real-time PCR, respectively. Sirt6 and LC3 expression in intestines and IEC-6 cells was detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** Histopathological analysis indicated that DEX treatment protected against I/R-induced intestinal epithelial damage and restored cell proliferation after OGD/R exposure in a dose-dependent manner. Compared with the I/R group, apoptosis in intestinal tissue of the DEX group was decreased significantly ($P < 0.01$), and of miR-146a, Sirt6 and LC3 II expression was increased significantly ($P < 0.05$). Consistent with the *in vivo* result, DEX significantly attenuated OGD/R-induced apoptosis of IEC-6 cells ($P < 0.01$) and significantly increased the expression of miR-146a, Sirt6 and LC3 II in IEC-6 cells *in vitro* ($P < 0.01$). Furthermore, miR-146a inhibitor treatment of IEC-6 cells supported that miR-146a inhibition attenuated DEX-induced improvement and inhibited autophagy activation by downregulating Sirt6 expression. **Conclusions** DEX has a protective effect against I/R injury by regulating miR-146a/Sirt6-mediated autophagy.

【Keywords】 miR-146a; Sirt6; autophagy; rat; dexmedetomidine; intestinal ischemia-reperfusion

缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 损伤是与高发病率和死亡率相关的常见病理过程,常继发于多种严重疾病^[1]。I/R 损伤的发病机制是多因素的,包括过度的炎性细胞因子释放、氧化应激和细胞凋亡^[2-3]。肠道 I/R 可能导致肠道屏障功能受损,肠道通透性增加和肠道菌群易位,导致严重的局部和全身炎症和多器官功能障碍综合征^[4]。右美托咪定 (dexmedetomidine, DEX) 是一种具有镇静和镇痛特性的 α_2 -肾上腺素受体激动剂。最近,DEX 已被鉴定为对多个器官的 I/R 损伤具有保护潜力^[5-6]。研究发现,DEX 可以保持肠道结构完整性并赋予肠道保护免受 I/R 损伤^[7]。然而,关于其潜在的机制仍然很大程度上未知。microRNA (miRNA) 作为一种小的非编码 RNA,通过抑制靶 mRNA 的翻译或稳定来调节转录后翻译^[8]。最近,一项研究报道 miR-146a 通过与 IRAK1 的 3' UTR 结合,可以抑制炎症细胞浸润,从而保护肾组织免受 I/R 损伤^[9]。在肠道 I/R 损伤方面,miR-146a 可通过调节自噬抑制肠上皮细胞凋亡,减轻 I/R 过程中的肠道损伤^[10]。值得注意的是,最近两项研究报道了 DEX 通过靶向 miR-146a 参与肺部和心脏保护^[11-12]。因此我们假设在肠道中,miR-146a 也可能在 DEX 对 I/R 损伤的保护功能中发挥作用,并旨在通过体内和体外研究评估它们之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠 (体重 200~220 g) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2019-0004]。大鼠饲养于西南医科大学实验动物中心 [SYXK (川) 2018-0003], 实验前 2 周使大鼠适应

实验室条件 ($(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、12 h/12 h 光照/黑暗、 $(50 \pm 5)\%$ 湿度、随意获取食物和水)。每笼饲养一只大鼠,实验前禁食 12 h。动物实验经西南医科大学附属医院动物实验伦理委员会审核批准 (XNYKLY-2021-016), 并严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.1.2 细胞

IEC-6 细胞 (大鼠小肠隐窝上皮细胞) 获自上海生命科学研究院,接种在含有 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 非必需氨基酸的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 美国 Gibco 公司) 中培养。每 2~3 d 更换 1 次培养基,培养物保持在 37°C 含有 5% CO_2 的饱和湿度环境中。

1.2 主要试剂与仪器

Hanks 平衡盐溶液购自美国 Gibco 公司; MTT 试剂、Sirt6、HRP 偶联的二抗购自美国 Abcam 公司; TUNEL 染色检测试剂盒购自德国 Roche 公司; 兔抗 LC3 单克隆抗体购自武汉 Proteintech 公司; TRIzol、lipofectamine 试剂购自美国 Invitrogen 公司; TransStart Top Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司; SYBRTM Select Master Mix 购自美国 Thermo 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; β -actin 购自美国 CST 公司; miR-146a 抑制剂 Opti-MEM 购自美国 Ambion 公司。

DM4000B 光学显微镜购自德国 Leica 公司, 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; RS232C 核酸测定仪购自德国 Eppendorf 公司; 7500 快速实时荧光定量 PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司; ChemiDoc XRS 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞氧-葡萄糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 模型和药物治疗

将 IEC-6 细胞 (每毫升 5×10^3 个) 接种在 96 孔

板中,当 80% 汇合时,细胞加入 DEX (0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$) 处理 1 h。之后,将细胞培养基更换为不含葡萄糖的 Hanks 平衡盐溶液,并在 37℃ 的加湿培养箱 (1% O_2 、94% N_2 和 5% CO_2) 中孵育 4 h 模拟缺氧条件。4 h 后,将培养基换回标准 DMEM 培养基并在常氧环境下再维持 2 h 来模拟复氧期^[13]。在没有药物处理的标准条件下培养的细胞用作对照。

为了考察 miR-146a 抑制对 DEX 保护作用的影响,将细胞实验分为:Con 组、OGD/R 组、OGD/R+DEX 组、OGD/R+miR-146a 抑制剂组和 OGD/R+DEX+miR-146a 抑制剂组。除 Con 组外,其他组建立 OGD/R 模型。OGD/R+miR-146a 抑制剂组和 OGD/R+DEX+miR-146a 抑制剂组在建立 OGD/R 模型前,加入 miR-146a 抑制剂处理 24 h。

1.3.2 细胞活力测定

使用 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑蓝 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 测定法评估细胞活力。在不同的时间点将 MTT 试剂添加到每个孔中。在 37℃ 下用 MTT 溶剂处理细胞 3 h,并在 OD 590 nm 处测量吸光度。

1.3.3 动物分组治疗

动物被随机分配到 3 组,包括假手术组 (Sham)、I/R 组和 DEX 组,每组 8 只大鼠。I/R 组和 DEX 组大鼠参照文献方法^[14]建立大鼠肠道 I/R 模型,具体操作为大鼠用异氟醚吸入麻醉。中线剖腹探查后,夹住肠系膜上动脉并在 1 h 后再灌注。DEX 组大鼠在缺血前 30 min 以腹腔注射 25 $\mu\text{g/kg}$ DEX 药物治疗^[14],和 I/R 组注射 0.9% 生理盐水治疗。Sham 组接受相同的麻醉和中线剖腹手术,但不夹住肠系膜上动脉。再灌注后 6 h 处死所有动物,取出肠组织进行生化分析。

1.3.4 组织病理学检查

大鼠肠组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡切片用苏木精-伊红 (HE) 溶液染色。最后,通过 DM4000B 光学显微镜获得染色图像。根据 Chiu's 评分^[14]评估不同组的相对肠损伤程度。

1.3.5 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记 (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling, TUNEL) 分析

采用 TUNEL 染色检测试剂盒进行 TUNEL 分析。收集对数期的 IEC-6 细胞并以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种在 24 孔板中。将浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$

的 DEX 加入细胞中预处理 12 h。OGD/R 损伤后,用 PBS 清洗细胞,在 12 孔板中加入 10% 甲醛固定 20 min。然后用 PBS 冲洗 3 次,用 0.5% Triton-100 渗透细胞 10 min。此外,为了检测体内细胞凋亡,石蜡组织切片用二甲苯和不同梯度的乙醇脱蜡至水合。PBS 冲洗 3 次后,将细胞或组织切片加入 100 μL (10 μL TdT + 95 μL 荧光素标记的 dUTP 溶液) TUNEL 混合液中,在 37℃ 湿暗箱中孵育 1 h。阴性对照 (Con) 组加入 100 μL 荧光素标记的 dUTP 溶液。最后,使用荧光显微镜以 200 倍放大倍率捕获图像。

1.3.6 免疫荧光测定

将肠组织切片水合并并在柠檬酸盐缓冲液中孵育,用于脱蜡后的抗原修复。然后将样品在室温下用 3% BSA 非特异性封闭 2 h,在 4℃ 湿暗箱中用兔抗 LC3 单克隆抗体 (稀释比 1:100) 孵育过夜。用 PBS 清洗 3 次后,将切片与 Alexa 荧光素标记的二抗孵育 1 h,然后在 37℃ 下用 DAPI 溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$) 染色 10 min。最后,通过荧光显微镜以 200 倍放大率获得免疫荧光图像。对于细胞分析,将 IEC-6 细胞 (每毫升 1×10^5 个细胞) 接种在 24 孔板中,然后用 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEX 预处理 12 h。接下来,细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min,OGD/R 损伤后用 0.5% Triton-100 冲洗 10 min。最后,将细胞与兔抗 LC3 一起孵育,其余步骤与大鼠样品相同。

1.3.7 定量实时 PCR 检测

使用 TRIzol 试剂从 IEC-6 细胞和大鼠肠组织中分离总 RNA,并使用 RS232C 核酸测定仪测定总 RNA 的浓度。然后使用 TransStart Top Green qPCR SuperMix 将总共 1000 ng RNA 被逆转录为 cDNA,并使用 SYBRTM Select Master Mix 在 7500 型实时荧光定量 PCR 系统上进行实时定量分析。本研究中基因的引物序列如下: U6: 5'-UGAGAACUGAAUCC AUGGGUU-3'; miR-146a-5p: 5'-UGAGAACUGAA UUCAUGGGUU-3'。

1.3.8 蛋白质印迹法

使用适当的冷裂解缓冲液从 IEC-6 细胞和肠组织中提取总蛋白,并使用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。然后将样品加载到 SDS-PAGE (8%~12%) 上,并转移到 PVDF 膜。将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h,与靶向 β -actin (1:2000), Sirt6 (1:1200 稀释) 和 LC3 (1:1000 稀释) 的一抗在 4℃ 下孵育过夜,后与 HRP 偶联的二抗 (1:5000) 在室温下孵育 1 h。

通过增强化学发光法和 ChemiDoc XRS 获取蛋白质条带图像。使用 Image J 软件计算条带强度,并将其归一化为 GAPDH 的条带强度。

1.3.9 体外抑制剂转染 miR-146a

IEC-6 细胞每毫升 5×10^3 个细胞接种在 24 孔板中。将 50 μL 含 miR-146a 抑制剂 (25 nmol/L, 终浓度) Opti-MEM 与含 1 μL lipofectamine 的 50 μL Opti-MEM 混合,并转染 IEC-6 细胞 6 h。然后用原始培养基再培养 24 h,用 DEX 预处理并建立 OGD/R 模型。等浓度的抑制剂阴性对照用作实验中非序列特异性效应的对照。最后,测定细胞凋亡、miR-146a 表达水平以及与信号相关的蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 SPSS 22.0 分析数据。使用 t 检验对两组之间的差异进行显著性评估,并使用单向方差分析 (ANOVA) 对两组以上的差异进行评估,然后进行事后 Tukey 或 Dunnett 多重比较检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DEX 在体内外对 I/R 和 OGD/R 损伤的保护作用

HE 染色显示,假手术组大鼠的肠粘膜上皮细胞完好无损,杯状细胞清晰可见。与假手术组相比,I/R 组大鼠肠黏膜上皮出现明显的肠道形态改变、大量炎性细胞浸润、固有层消化崩解、出血、溃疡形成。DEX 组的肠道形态学改变显著改善,其特

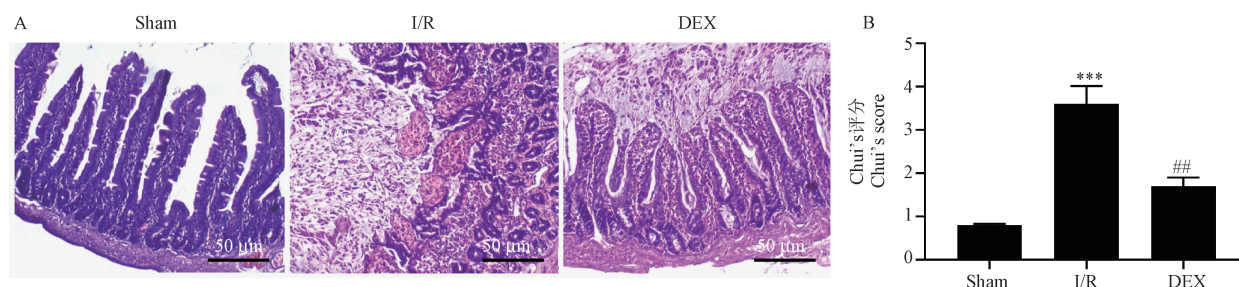
征是肠道组织学损伤评分 (Chiu's score) 降低。组织病理学分析表明 DEX 处理对 I/R 诱导的肠上皮损伤具有保护作用 (图 1)。为了模拟肠 I/R,对 IEC-6 细胞进行 4 h 的氧-葡萄糖剥夺,然后进行复氧 (OGD/R)。与对照组相比,在 OGD/R 暴露后观察到细胞活力大大降低。相反,DEX 治疗以剂量依赖性方式恢复细胞增殖并促进细胞存活。此外,由于 DEX 在 2 $\mu\text{mol/L}$ 时表现出最佳保护性能,存活率约为 90% (图 2),因此选择该浓度用于后续分析。

2.2 DEX 在体内和体外对 I/R 和 OGD/R 损伤后细胞凋亡的抑制作用

与 Sham 组相比,I/R 组大鼠肠道细胞凋亡显著增加 ($P < 0.001$)。DEX 组细胞凋亡显著低于 I/R 组 ($P < 0.01$) (图 3)。与体内结果一致,体外研究发现 DEX 显著减轻 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞凋亡 ($P < 0.01$) (图 4)。

2.3 DEX 对体外和体内 miR-146a/Sirt6 信号和 LC3 水平的影响

先前研究报道了 DEX 通过靶向 miR-146a/Sirt6 信号参与肺部保护^[11],为考察 DEX 是否通过靶向 miR-146a/Sirt6 信号在对 I/R 损伤的保护功能中发挥作用,研究考察 DEX 对体外和体内 miR-146a/Sirt6 信号的影响。与 Sham 组相比,I/R 组 miR-146a、Sirt6 在大鼠肠道组织中表达显著下调 ($P < 0.001$)。DEX 治疗显著增加了 I/R 大鼠肠道组织中 miR-146a、Sirt6 表达 ($P < 0.01$) (图 5、图 6)。与体内结果一致,体外研究发现 DEX 显著增加了 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞中 miR-146a 表达下调 ($P < 0.01$) (图 5)。此外,蛋白质印迹和免疫荧光测

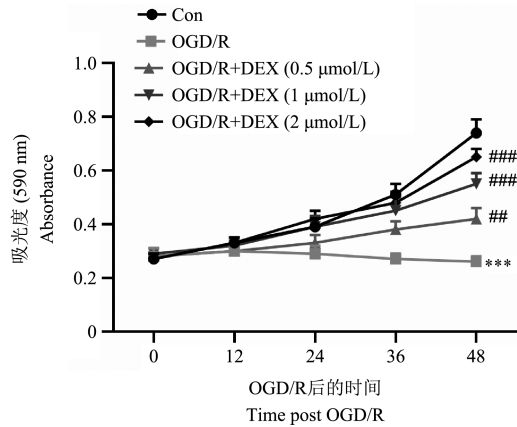


注:A:大鼠的肠粘膜的 HE 染色结果;B:Chui's 评分。与 Sham 组相比,*** $P < 0.001$;与 I/R 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 1 DEX 在体内对 I/R 损伤的保护作用 (HE 染色, $n = 8$)

Note. A, HE staining results of the rat intestinal mucosa. B, Chui's score. Compared with the Sham group, *** $P < 0.001$. Compared with the I/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Protective effect of DEX against I/R injury *in vivo* (HE staining)

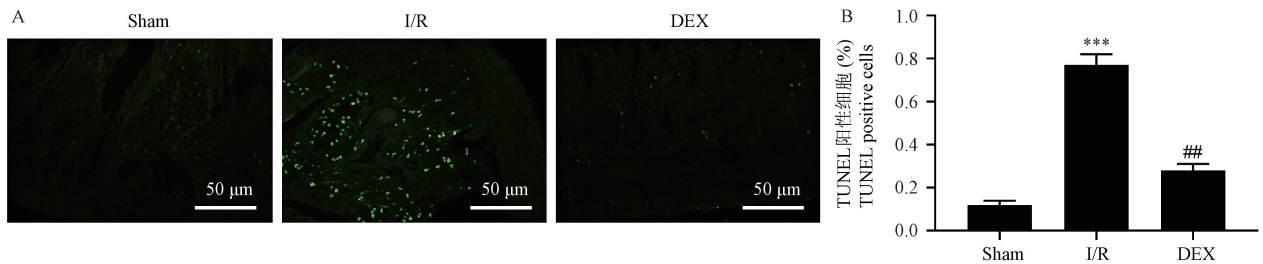


注:与 Con 组相比,*** $P<0.001$;与 OGD/R 组相比,## $P<0.01$ 、### $P<0.001$ 。

图 2 OGD/R 损伤和 DEX 处理对肠细胞增殖的影响

Note. Compared with Con group, *** $P<0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 2 Effects of OGD/R injury and DEX treatment on intestinal cell proliferation

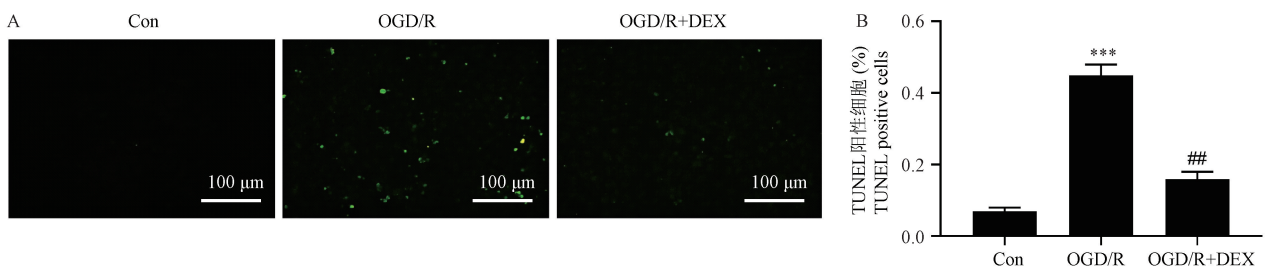


注:A:大鼠的肠粘膜的 TUNEL 染色结果;B:TUNEL 阳性细胞定量分析。与 Sham 组相比,*** $P<0.001$;与 I/R 组相比,## $P<0.01$ 。

图 3 DEX 在体内对 I/R 损伤后细胞凋亡的抑制作用(TUNEL 染色, $n=8$)

Note. A, TUNEL staining results of rat intestinal mucosa. B, Quantitative analysis of TUNEL positive cells. Compared with the Sham group, *** $P<0.001$. Compared with the I/R group, ## $P<0.01$.

Figure 3 Inhibitory effect of DEX on apoptosis after I/R injury *in vivo* (TUNEL staining)



注:A:IEC-6 细胞的 TUNEL 染色结果;B:TUNEL 阳性细胞定量分析。与 Con 组相比,*** $P<0.001$;与 OGD/R 组相比,## $P<0.01$ 。

图 4 DEX 在体外对 OGD/R 损伤后细胞凋亡的抑制作用(TUNEL 染色, $n=3$)

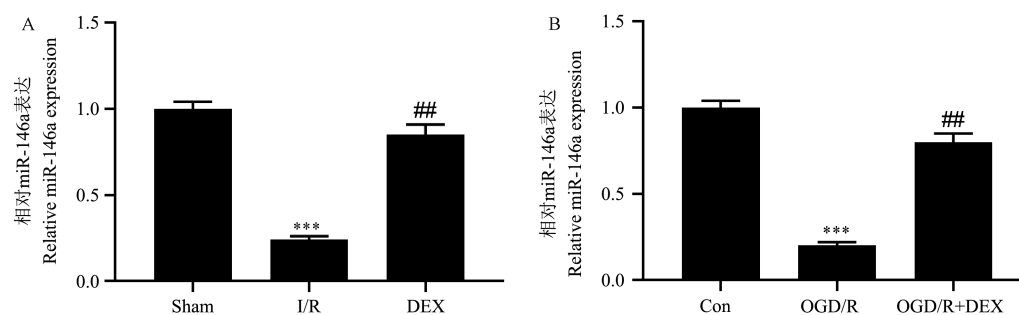
Note. A, TUNEL staining results of IEC-6 cells. B, Quantitative analysis of TUNEL-positive cells. Compared with Con group, *** $P<0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P<0.01$.

Figure 4 TUNEL staining analysis of the effect of DEX on OGD/R injury-induced apoptosis of intestinal epithelial cells (TUNEL staining)

定用于检测体内和体外 LC3 的表达水平。如图 6 所示,与 Sham 组或对照组相比,I/R 组和 OGD/R 组 LC3 II 的表达水平降低,DEX 增加了 LC3 II 水平。免疫荧光证实了蛋白质印迹结果,DEX 显著增加了 I/R 大鼠肠组织和 OGD/R 处理的 IEC-6 细胞中 LC3 水平(图 7)。

2.4 在体外阻断 miR-146a 后 DEX 对细胞凋亡的影响

用 miR-146a 抑制剂转染 IEC-6 细胞,然后在 OGD/R 损伤前用 DEX 预处理。如图 8 所示,miR-146a 抑制剂降低了 DEX 治疗诱导的 miR-146a 上调($P<0.01$)。与 OGD/R 组相比,miR-146a 抑制剂显著增加了凋亡细胞的数量,并减少了 Sirt6、LC3 II 的表达水平。此外,与 OGD/R+DEX 组相比,OGD/R+DEX+miR-146a 抑制剂组凋亡细胞的数量显著增加($P<0.05$),和 Sirt6、LC3 II 的表达水平显著减少($P<0.01$)(图 9~图 11)。

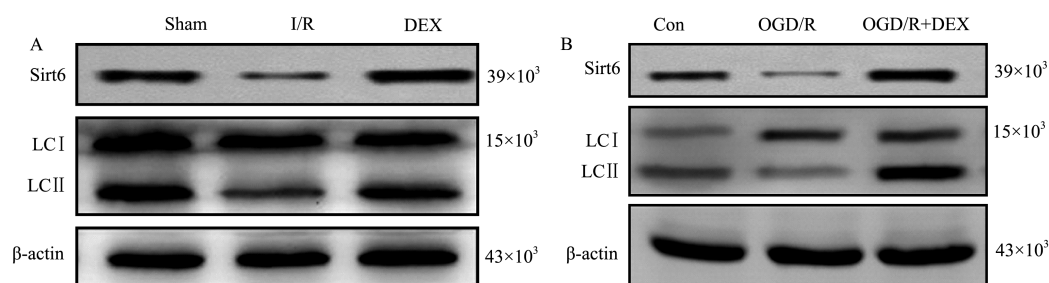


注: A; DEX 对 I/R 损伤大鼠肠组织中 miR-146a 表达水平影响; B; OGD/R 损伤诱导的肠上皮细胞中 miR-146a 表达水平影响。与 Sham 组或 Con 组相比, *** $P < 0.001$; 与 I/R 组或 OGD/R 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 5 DEX 对体外和体内 miR-146a 水平的影响

Note. A, Effect of DEX on the expression level of miR-146a in intestinal tissue of rats with I/R injury. B, Effect of miR-146a expression level in OGD/R injury-induced intestinal epithelial cells. Compared with Sham group or Con group, *** $P < 0.001$. Compared with I/R group or OGD/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Effects of DEX on miR-146a levels *in vitro* and *in vivo*

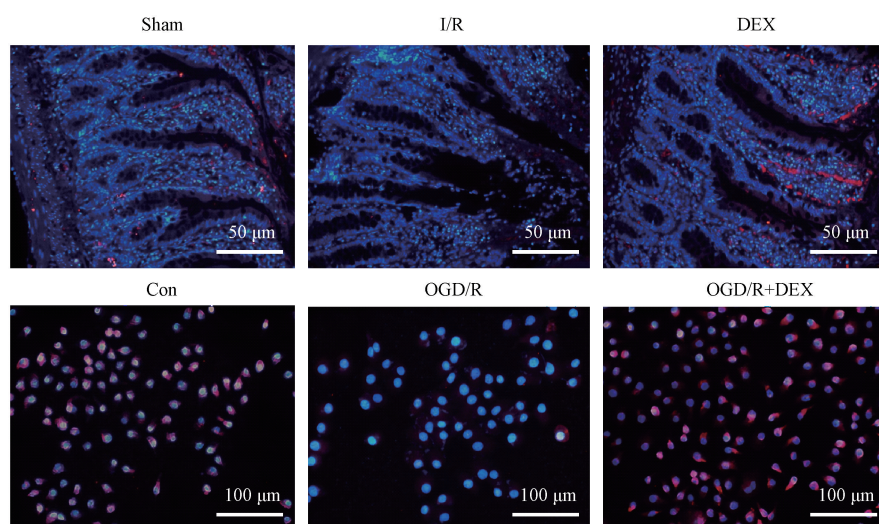


注: A; DEX 对 I/R 损伤大鼠肠组织中 Sirt6、LC3 表达水平影响; B; OGD/R 损伤诱导的肠上皮细胞中 Sirt6、LC3 表达水平影响。

图 6 DEX 对体外和体内 Sirt6 和 LC3 水平的影响

Note. A, Effect of DEX on the expression levels of Sirt6 and LC3 in the intestinal tissue of I/R injured rats. B, Effect of the expression levels of Sirt6 and LC3 in the intestinal epithelial cells induced by OGD/R injury.

Figure 6 Effects of DEX on Sirt6 and LC3 levels *in vitro* and *in vivo*



注: A; DEX 对 I/R 损伤大鼠肠组织中 LC3 表达水平影响; B; OGD/R 损伤诱导的肠上皮细胞中 LC3 表达水平影响。

图 7 DEX 对体外和体内 Sirt6、LC3 水平的影响(免疫荧光染色)

Note. A, Effect of DEX on the expression level of LC3 in the intestinal tissue of I/R injured rats. B, Effect of the LC3 expression level in the intestinal epithelial cells induced by OGD/R injury.

Figure 7 Effect of DEX on Sirt6 and LC3 levels *in vitro* and *in vivo* (Immunofluorescence staining)

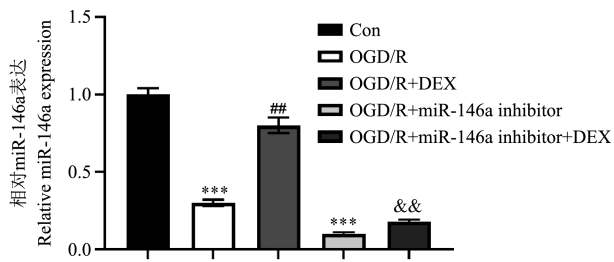
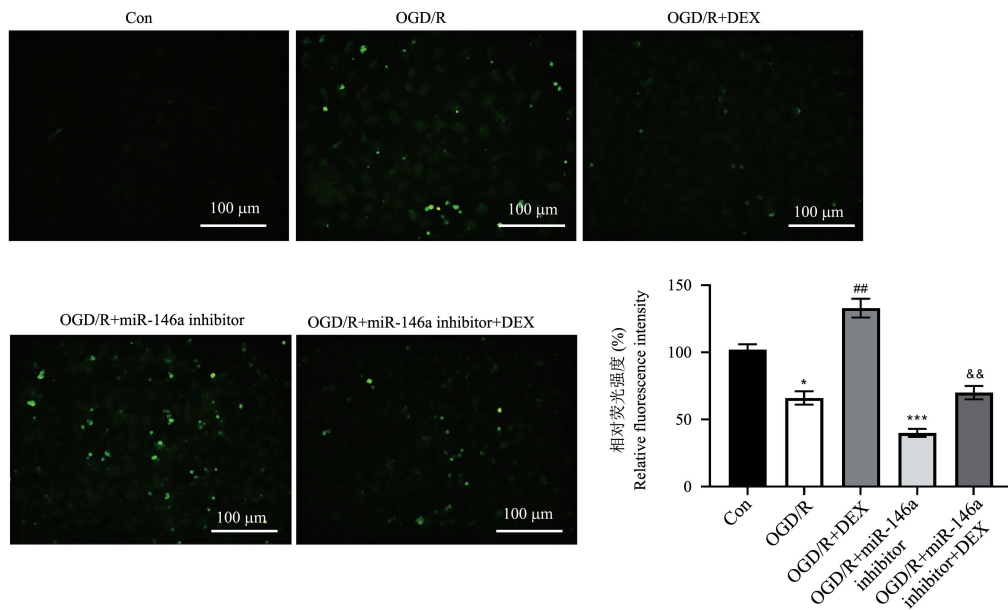


图 8 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞中 miR-146a 表达

Figure 8 Transfection of miR-146a inhibitor affects the expression of miR-146a in IEC-6 cells by DEX

3 讨论

肠道 I/R 损伤作为临床常见的严重疾病,威胁患者生命。肠道黏膜是肠道菌群与其内毒素之间的屏障^[6]。I/R 损伤引起的粘膜破坏可出现肠道细菌转移到体循环系统,并导致组织坏死、严重代谢紊乱和全身炎症反应综合征的快速进展^[6]。DEX 是一种成熟的治疗药物,先前研究发现 DEX 通过抑制炎症和细胞凋亡对肝、肾、脑和胃 I/R 损伤具有保护作用^[15-16]。然而,DEX 影响肠道 I/R 损伤的分子机制仍不清楚。本研究的结果表明,DEX 预处理显

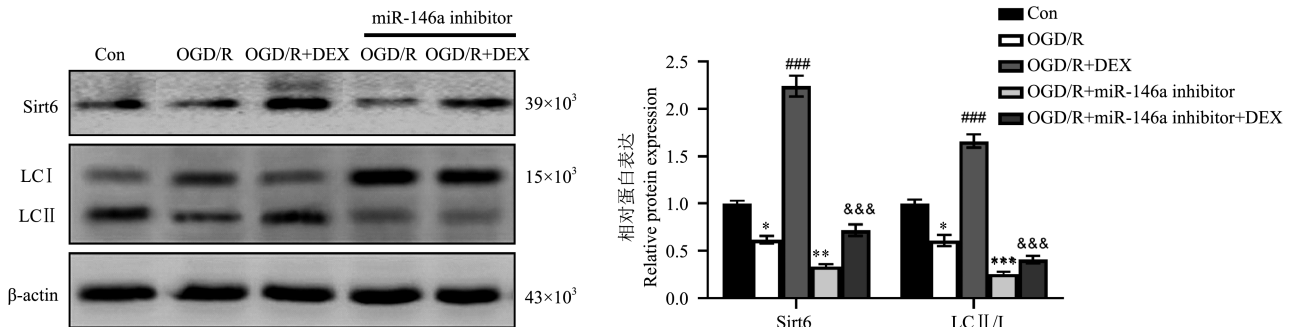


注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比, ## $P < 0.01$;与 OGD/R+DEX 组相比, && $P < 0.01$ 。

图 9 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞凋亡的保护(TUNEL 染色, $n = 3$)

Note. Compared with Con group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P < 0.01$. Compared with OGD/R+DEX group, && $P < 0.01$.

Figure 9 Transfection of miR-146a inhibitor affects the protection of DEX against apoptosis of IEC-6 cells (TUNEL staining)

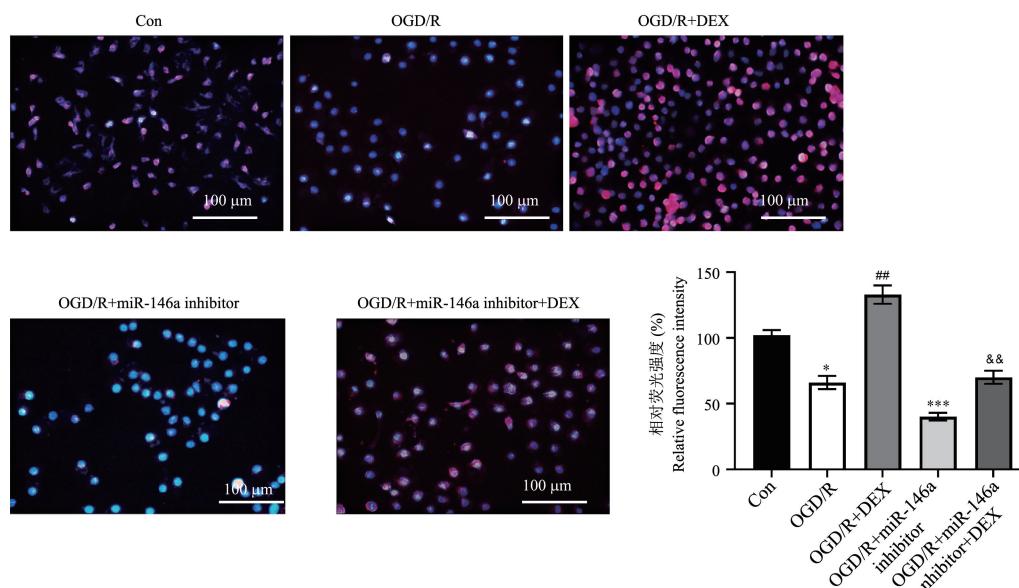


注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比, ### $P < 0.01$;与 OGD/R+DEX 组相比, &&& $P < 0.01$ 。

图 10 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞中 Sirt6、LC3 II 蛋白表达影响

Note. Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ### $P < 0.001$. Compared with OGD/R+DEX group, &&& $P < 0.01$.

Figure 10 Transfection of miR-146a inhibitor affects the effect of DEX on the expression of Sirt6 and LC3 II proteins in IEC-6 cells



注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比, ## $P < 0.01$;与 OGD/R+DEX 组相比, && $P < 0.01$ 。

图 11 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞中 LC3 蛋白表达(免疫荧光染色, $n = 3$)

Note. Compared with Con group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P < 0.01$. Compared with OGD/R+DEX group, && $P < 0.01$.

Figure 11 Transfection of miR-146a inhibitor affected the expression of LC3 protein in IEC-6 cells by DEX (Immunofluorescence staining)

著改善了 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞活力下降,并且 DEX 可改善肠道 I/R 诱导的组织病理学损伤并降低 Chiu 评分,这是肠黏膜损伤的重要指标^[6]。此外,DEX 显著降低了凋亡细胞的数量,提示 DEX 对 I/R 损伤的保护作用可能与抑制细胞凋亡有关。

自噬作为细胞稳态的关键调节剂,在自噬性细胞死亡中起重要作用,并作为信号平台促进不同细胞死亡途径的激活和整合,选择性降解自噬相关因子^[17]。例如,增加的自噬活性有助于缓解肠道 I/R 诱导的炎症反应^[2]。此外,自噬通过降解哺乳动物细胞中的抗凋亡因子或受损分子和细胞器先于细胞凋亡^[18]。目前认为,自噬在缺血性疾病中发挥有益还是有害作用取决于环境压力因素,包括氧气可用性的变化、I/R 损伤的严重程度,以及不同器官对缺血的耐受性,可能导致受影响器官中自噬通量的变化^[19]。本研究表明,DEX 预处理上调了肠道 I/R 损伤中的自噬活性,其特征是在体内和体外均增加了 LC3 II 水平。由于自噬是一个高度动态和多步骤的过程,自噬标记蛋白 LC3 水平的增加可能是自噬活性增加或自噬体-溶酶体融合受阻的结果^[20]。因此,我们的研究结果表明,DEX 通过增强自噬活性来减轻肠道 I/R 损伤。

越来越多的证据表明 miRNA 分子可以作为各

种疾病的靶向治疗剂。先前的研究发现,miR-146a 可以缓解 I/R 损伤,例如肾 I/R 和心肌 I/R 损伤^[9,21]。至于肠道 I/R 损伤,之前的研究表明 miR-146a 在 I/R 和 OGD/R 期间的表达降低,并且在 OGD/R 期间抑制 miR-146a 表达进一步抑制自噬并加重细胞死亡,而 miR-146a 过表达通过上调 Sirt6 增加体外自噬激活来减轻 OGD/R 损伤。提示 miR-146a/Sirt6 信号通过调节自噬作用于 OGD/R^[10,22]。此外,先前研究已经证实了 miR-146a 可以通过靶向 Sirt6 来调节炎症、氧化应激、纤维化等病理过程^[23]。本研究发现,DEX 在体内和体外均增加了 miR-146a/Sirt6 信号水平。Sirt6 介导的自噬在控制凋亡信号传导中起关键作用。为了进一步研究 DEX 对 miR-146a/Sirt6 信号的影响,我们在体外进行了 miR-146a 抑制剂测试,并发现 miR-146a 抑制剂削弱 DEX 诱导的改善作用,还通过下调 Sirt6 表达抑制自噬激活。这些发现表明,DEX 通过激活 OGD/R 受损的自噬通量来减轻 OGD/R 损伤。

此外,DEX 对 I/R 损伤的保护作用很可能还涉及除 miR-146a/Sirt6 级联之外的许多细胞功能。据报道,DEX 上调 HIF-1 α 以抑制 I/R 诱导的神经元自噬^[24]。ERK 和 Akt 信号通路参与 DEX 介导的肾 I/R 损伤中氧化应激和炎症的减弱^[15]。此外,也有

报道称 DEX 通过 PPAR γ /STAT3 信号通路调节巨噬细胞 M2 的活化来减轻肝的 I/R 损伤^[6]。这与我们模型中观察到的细胞凋亡减少一致,表明在 I/R 损伤和 DEX 治疗期间存在复杂的细胞间通讯。总体而言,所有这些发现都确定了 DEX 赋予保护功能的复杂性,而对潜在机制的更严格探索不仅需要扩大我们对 I/R 的了解,而且还需要提供针对 I/R 损伤的新预防策略。

参考文献:

- [1] 陈榕,李维,曾滋,等. 自噬在缺血后处理减轻小鼠肠缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(4): 412-415.
- [2] Li B, Yao X, Luo Y, et al. Inhibition of autophagy attenuated intestinal injury after intestinal I/R via mTOR signaling [J]. J Surg Res, 2019, 243: 363-370.
- [3] Barzegar M, Kaur G, Gavins FNE, et al. Potential therapeutic roles of stem cells in ischemia-reperfusion injury [J]. Stem Cell Res, 2019, 37: 101421.
- [4] Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, et al. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury [J]. J Clin Biochem Nutr, 2018, 63(1): 26-32.
- [5] Sun Z, Zhao T, Lv S, et al. Dexmedetomidine attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury through both anti-inflammation and anti-apoptosis mechanisms in rabbits [J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 209.
- [6] He L, Hao S, Wang Y, et al. Dexmedetomidine preconditioning attenuates ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts with endothelial dysfunction [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 114: 108837.
- [7] 李斌,唐隽娇,何祥虎,等. 右美托咪定通过激活 PI3K/Akt 通路对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(1): 15-19.
- [8] 唐剑,刘艳秋,高鸿,等. 低温缺血再灌注心律失常大鼠心肌 miRNA 表达的变化及靶基因预测[J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(7): 885-888.
- [9] Li X, Liao J, Su X, et al. Human urine-derived stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury in a rat model via exosomal miR-146a-5p which targets IRAK1 [J]. Theranostics, 2020, 10(21): 9561-9578.
- [10] Liu ZZ, Leng WT, Zhang JM, et al. miR-146a-5p/TXNIP axis attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy via the PRKAA/mTOR signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 197: 114839.
- [11] Li N, Li S, Wu Y, et al. Dexmedetomidine targets miR-146a and participates in the progress of chronic obstructive pulmonary disease *in vivo* and *in vitro* [J]. Genes Genomics, 2021, 43(12): 1371-1379.
- [12] He L, Wang Z, Zhou R, et al. Dexmedetomidine exerts cardioprotective effect through miR-146a-3p targeting IRAK1 and TRAF6 via inhibition of the NF- κ B pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110993.
- [13] Li LX, Yin LH, Gao M, et al. MiR-23a-5p exacerbates intestinal ischemia-reperfusion injury by promoting oxidative stress via targeting PPAR alpha [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 180: 114194.
- [14] Liu XM, Chen QH, Hu Q, et al. Dexmedetomidine protects intestinal ischemia-reperfusion injury via inhibiting p38 MAPK cascades [J]. Exp Mol Pathol, 2020, 115: 104444.
- [15] Li J, Chen Q, He X, et al. Dexmedetomidine attenuates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury through α_2 AR/PI3K/Akt pathway [J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 78.
- [16] Li P, Zhang Y, Liu H. The role of Wnt/ β -catenin pathway in the protection process by dexmedetomidine against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Life Sci, 2019, 236: 116921.
- [17] 黄基峰,张怡,晏琛. 线粒体自噬在肿瘤干细胞中作用的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2020, 47(5): 255-259.
- [18] Yang Y, Dong F, Liu X, et al. Crosstalk of oxidative damage, apoptosis, and autophagy under endoplasmic reticulum (ER) stress involved in thifluzamide-induced liver damage in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environ Pollut, 2018, 243: 1904-1911.
- [19] Xu D, Chen L, Chen X, et al. The triterpenoid CDDO-imidazole ameliorates mouse liver ischemia-reperfusion injury through activating the Nrf2/HO-1 pathway enhanced autophagy [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e2983.
- [20] Zhao H, Chen H, Xiaoyin M, et al. Autophagy activation improves lung injury and inflammation in sepsis [J]. Inflammation, 2019, 42(2): 426-439.
- [21] Shu L, Zhang W, Huang G, et al. Troxerutin attenuates myocardial cell apoptosis following myocardial ischemia-reperfusion injury through inhibition of miR-146a-5p expression [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 9274-9282.
- [22] Akbari G. Emerging roles of microRNAs in intestinal ischemia/reperfusion-induced injury: a review [J]. J Physiol Biochem, 2020, 76(4): 525-537.
- [23] Xiao X, Xu M, Yu H, et al. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 354.
- [24] Gao Y, Yin H, Zhang Y, et al. Dexmedetomidine protects hippocampal neurons against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis through activation HIF-1 α /p53 signaling [J]. Life Sci, 2019, 232: 116611.

[收稿日期]2022-06-22