

右美托咪定通过 PI3K/Akt 信号通路减轻梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡

刘 焯¹, 解雅英²

(1. 天津市北辰医院 麻醉科, 天津 300400; 2. 内蒙古医科大学附属医院 麻醉科)

摘要:目的:探究右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(phosphoinositide-3-kinase/ protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路减少梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)大鼠肝细胞凋亡的各种作用。方法:选取40只合格雄性清洁型Wistar大鼠,7~9周龄,体重为220~270g。按照随机数字表法分为4组:LY294002+右美托咪定组(L组)、梗阻性黄疸组(OJ组)、右美托咪定组(D组)、假手术组(S组)。前三组需要制作大鼠梗阻性黄疸模型,S组仅开腹胆总管探查、游离。D组完成造模72h后在腹腔注射右美托咪定注射液,剂量为100μg/kg,S组和OJ组同时注射等容量0.9%无菌生理盐水,L组在给Dex10min前经尾静脉缓慢泵入PI3K抑制剂LY294002(10%DMSO配置10mmol/L)0.3mg/kg。注药3h后四组大鼠取肝右外叶1.0cm×1.0cm×0.5cm2份,HE染色观察肝组织病理学变化;TUNEL法计算肝细胞凋亡指数(AI);Western Blot法测定肝组织Akt、磷酸化Akt(p-Akt)的表达水平;免疫组化法检测肝组织Bcl-2及Bax阳性细胞计数。结果:D组肝脏组织病理学损伤较L和OJ组减轻;OJ组较S组大鼠肝细胞TUNEL检测值、p-Akt、Bcl-2降低,Bax升高;D组较OJ组大鼠肝细胞TUNEL检测值、p-Akt、Bax降低,Bcl-2升高;L与D组相比,其大鼠肝细胞TUNEL检测值、p-Akt、Bcl-2降低,Bax升高。结论:右美托咪定可通过激活PI3K/Akt信号通路减少梗阻性黄疸时肝细胞凋亡。

关键词:急性心肌梗死;经皮冠状动脉介入术;术后无复流;sLOX-1;ITLN-1

中图分类号: R575.7

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2021)01-0078-04

OJ是临床上比较常见的复杂疾病,内蒙各地区由于地理条件和生活习惯等因素影响已经成为OJ的高发地区。OJ可导致脏器损害更甚至导致多器官功能衰竭,而肝脏是最早受累的器官,同时也是其它器官损害的重要诱因。所以选对肝脏保护作用的麻醉药物对OJ患者疾病的发展、并发症的预防防治、以及疾病的预后康复具有重要的临床意义。Dex可以调节细胞凋亡,并具有抗炎、镇静作用。PI3K/Akt通路是细胞膜受体介导的直接作用于细胞内的信号转导通路,调控凋亡特异性蛋白维持细胞存活和增殖,抑制细胞凋亡^[1]。有学者^[2]研究表明,Dex激活PI3K/Akt信号通路,上调Bcl-2的表达,抑制下游caspase-3的活化,减少离体胎鼠海马神经元的凋亡,具有神经保护作用。此次实验制作OJ大鼠模型,模型造好后72h腹腔注射一定剂量的Dex进行干预,同时设立PI3K特异性抑制剂LY294002的对照组,在给药后3h取肝右外叶组织,进行HE染色观察肝组织病理学变化;Western Blot法测定肝组

织Akt、磷酸化Akt(p-Akt)的表达水平;TUNEL法计算肝细胞凋亡指数(AI);免疫组化法检测肝组织Bcl-2及Bax阳性细胞计数。通过此次研究得出的结果,在进一步分析再论证Dex对OJ大鼠肝细胞凋亡的影响,同时明确该影响是否与Dex激活PI3K/Akt信号通路有关,与调节凋亡相关基因Bax/Bcl-2的表达相关,可为临床上OJ引起的肝损伤的防治和在肝保护药物选择方面可以提供新的思路。

1 材料与方法

Wistar雄性清洁大鼠为40只,均为7~9周龄,体重在220~270g,均来自内蒙古医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(蒙)2015-0001。由动物实验医学伦理委员会批准,规定适应喂养7天的标准条件。大鼠随机分为4组,每组10只:梗阻性黄疸组(OJ组);LY294002+右美托咪定组(L组);假手术组(S组);右美托咪定组(D组)。

收稿日期:2020-09-14; 修回日期:2020-12-24

基金项目:内蒙古自治区卫生计生科研计划(201701070)

作者简介:刘焯(1992-),女,天津市北辰医院麻醉科住院医师。

通讯作者:解雅英,主任医师,E-mail:xyy7156@qq.com 内蒙古医科大学麻醉科,010050

参考 Assimakopoulos^[3]方法建立大鼠梗阻性黄疸模型,4组大鼠术前不禁水、均需禁食12h。L、OJ及D组:称重后腹腔注射10%水合氯醛3mL/kg,麻醉起效后将大鼠固定在动物解剖台上,备皮、碘伏消毒,取上腹正中2.5cm切口进入腹腔,沿十二指肠找到一条纤细、透亮、淡黄色的细管通向十二指肠,即胆总管,然后用4-0丝线双重结扎。结扎完成术野无出血后,逐层缝合切口关腹,放入笼内继续饲养。S组:麻醉同前,仅行胆总管游离后缝合切口关腹。给药剂量参照《实验动物学》^[4]。

L和D组造模后3天腹腔注射100μg/kg右美托咪定注射液(批号:20170802,江苏恩华药业股份有限公司),S和OJ组注射同等量0.9%的无菌生理盐水。并使L组在Dex给药的10min前尾静脉泵入PI3K特异性抑制剂LY294002(10% DMSO配置10mmol/L)0.3mg/kg。均根据实验设定时间点给药后3h使用10%水合氯醛剂量为:3mL/kg腹腔内注射麻醉,循缝合后原切口切开后进腹,在活体状态下取大鼠肝右外叶1.0cm × 1.0cm × 0.5cm 2份,一份放入-80℃冰箱保存,通过Western blot法(抗体采购于Cell signaling)检测肝脏组织Akt、p-Akt的表达,加入含PMSF裂解液中,离心后取上清液,用电转移法将分离的蛋白转移到PVDF膜上,4℃温育并过夜,再加入封闭液稀释后浓度为1:50000的二抗(HRP标记羊抗小鼠)37℃摇床孵育2h,使用抗β-actin兔多克隆抗体作为对照,进行曝光成像^[5]。使用BandScan分析胶片的灰度值,通过目标蛋白条灰度值与内参β-actin蛋白条带灰度值的比值,来表示肝脏组织Akt、p-Akt的相对表达水平。

另一份标本放置于4%多聚甲醛中固定,进行脱水、固定、石蜡切片、HE染色,再光学显微镜(Olympus公司,日本)下观察肝组织病理学变化。将制好的石蜡切片烤片和脱蜡后,TUNEL法计算肝细胞凋亡指数(AI),免疫组化法测定肝组织Bcl-2及Bax阳性细胞计数^[5]。

采用了SPSS 13.0软件包对其进行统计学分析,使用Shapiro-Wilk方法进行正态分布检验,并用定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,而组间比较采用单因素方差分析法,两两比较采用t检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Dex对OJ大鼠肝脏病理学改变

S组伴有少量炎症细胞浸润肝细胞;OJ组肝细胞坏死伴大量炎症细胞浸润;L组肝细胞形态较D组异常,肝窦淤血加重,炎症细胞浸润明显增多;D组肝细胞形态较OJ组正常,肝窦充血及炎症细胞浸润少,但门静脉及小叶静脉仍有增生(见图1)。

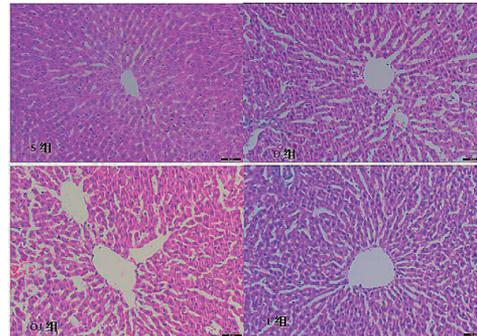


图1 四组大鼠肝脏病理结果

2.2 Dex对OJ大鼠肝细胞凋亡的影响

OJ组较S组肝细胞TUNEL检测值升高($P<0.05$),L组大鼠肝细胞TUNEL检测水平高于D组($P<0.05$),D组大鼠肝细胞TUNEL检测值明显低于OJ组($P<0.05$)(见表1,图2)。

表1 各组肝细胞凋亡指数($\bar{x} \pm s, n=10$)

	S组	OJ组	DEX组	L组
凋亡指数	0.81 ± 0.12	22.53 ± 0.17*	8.40 ± 0.18#	19.31 ± 0.43**

注:与S组相比,* $P<0.05$;与OJ组相比,# $P<0.05$;与DEX组相比,** $P<0.05$ 。

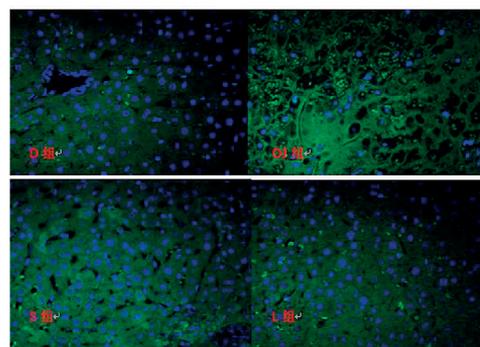


图2 四组大鼠肝脏TUNEL染色结果

2.3 Dex对OJ大鼠肝组织Bax和Bcl-2表达的影响

与S组进,OJ组大鼠肝组织中Bcl-2和Bax的表达均升高($P<0.05$);D组较OJ组大鼠肝组织中Bcl-2表达上调,Bax表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$);相比于D组,L组大鼠肝组织中Bcl-2表达下调,Bax表达上调($P<0.05$)(见表2)。

表2 各组Bcx/Bcl-2阳性细胞计数($\bar{x} \pm s, n=10$)

	S组	OJ组	DEX组	L组
Bcl-2	0.6 ± 0.52	8.64 ± 0.51*	34.75 ± 3.53 [#]	15.99 ± 1.50**
Bax	4.2 ± 2.66	42.64 ± 0.75*	20.91 ± 1.14 [#]	31.75 ± 0.39**

注:与S组相比,* $P < 0.05$;与OJ组相比,[#] $P < 0.05$;与DEX组相比,** $P < 0.05$ 。

2.4 Dex对OJ大鼠肝组织Akt和p-Akt表达水平的影响

各组p-Akt均有不同程度的变化,但总Akt蛋白变化含量不大。S组较OJ组大鼠肝组织中p-Akt蛋白表达下调($P < 0.05$);相比于OJ组,D组大鼠肝组织中p-Akt显著上调($P < 0.05$);与D组相比,L组大鼠肝组织中p-Akt表达降低($P < 0.05$)。(见表3,图3)。

表3 各组Akt/P-Akt表达情况($\bar{x} \pm s, n=10$)

	S组	OJ组	DEX组	L组
Akt	0.6 ± 0.01	0.59 ± 0.03	0.57 ± 0.06	0.59 ± 0.05
P-Akt	0.14 ± 0.03	0.28 ± 0.02*	0.47 ± 0.02 [#]	0.31 ± 0.01**

注:与S组相比,* $P < 0.05$;与OJ组相比,[#] $P < 0.05$;与DEX组相比,** $P < 0.05$ 。

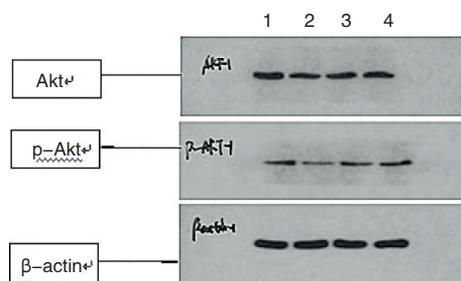


图3 各组大鼠Akt/p-Akt表达水平

注:图中 β -actin为标准参照物,1为D组,2为S组,3为OJ组,4为L组

3 讨论

本实验大鼠梗阻性黄疸模型中行双重结扎胆总管的手术方式,3天后观察到大鼠一般身体状态下降明显,伴随食欲明显下降,尿液颜色呈现深黄,尾部、耳廓等区域毛发覆盖少处皮肤颜色变黄,红色巩膜处变浅,大便变成白陶土色,各种现象表明模型制备成功。

此次应用了TUNEL染色法观察到以下几点:(1)OJ组大鼠有出现肝细胞凋亡现象;(2)与S组相比,OJ组、D组和L组大鼠肝细胞凋亡明显增多,肝小叶结构破坏比较明显,这表明OJ会直接导致肝细胞的凋亡,从而引起肝功能受损。通过以往研究表明,OJ时肝细胞发生凋亡的情形可能有:(1)胆盐排

泄障碍^[6];(2)线粒体功能障碍以及肝脏能荷的消耗^[7];(3)氧自由基生成增加^[8];(4)钙超载^[9];(5)释放大细胞因子^[10,11]等,但其具体分子机制仍未阐明。

PI3K/Akt通路是细胞膜受体介导的信号转导通路,通过调控凋亡特异性蛋白维持细胞存活和增殖,抑制细胞凋亡^[12]。同时,Tüfek A等发现,抗凋亡蛋白Bcl-2表达于OJ大鼠肝组织中,并且其表达水平随OJ时间的延长、肝细胞凋亡的增加而增加,说明OJ时PI3K/Akt信号通路参与肝细胞凋亡的过程^[13]。故我们选择大鼠肝脏组织p-Akt和凋亡相关基因Bcl-2/Bax的表达水平作为大鼠OJ时肝细胞凋亡的检测指标。

Dex是一种新型的高选择性的 α 2-肾上腺素受体激动剂,广泛应用于临床,具有镇静、催眠、镇痛、抗交感神经等作用,可用于麻醉和重症监护^[14]。近年在基础实验研究中发现,Dex所发挥作用的机理一般主要包括中枢机制以及外周机制,并通过下调因创伤所导致的脂质过氧化而应激反应^[15],从而有效降低伤害性刺激所引起的免疫性炎症反应介导促炎性细胞因子的过度生成,从而有效保护脆弱的中枢神经系统,减弱由于脏器缺血再次灌注损伤中产生的细胞凋亡结局,对脑、肺、心、肾等多种脏器具有正向作用。

在此次实验中,我们详细分析了OJ时肝组织Bax/Bcl-2阳性细胞计数及p-Akt的表达水平,D组中Bax/Bcl-2阳性细胞计数有所增加,但OJ组Bax表达D组弱,Bcl-2表达D组强,OJ组和D组p-Akt表达均有所增加,D组比OJ组p-Akt表达增加,给予PI3K特异性抑制剂LY294002后OJ组肝细胞凋亡程度又明显加重,提示Dex通过激活PI3K/Akt信号通路,来调节大鼠肝脏组织中Bax和Bcl-2的表达水准来抑制肝细胞凋亡。

综上所述,本实验探讨了Dex对梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡的影响,结果表明Dex可明显改善梗阻性黄疸引起的肝组织结构损伤,减少肝细胞凋亡,肝组织中p-Akt表达上升,上调抵抗凋亡基因Bcl-2的表达水平,下调促进凋亡基因Bax的表达水平。这表示,PI3K/Akt信号通路的激活可能是右美托咪定对梗阻性黄疸患者肝脏发挥保护作用的机制之一。

参考文献

[1] Sun L, Dai JJ, Hu WF, et al. Expression of toll-like receptors in hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Genet

- MolRes, 2016; 15(2):1-15
- [2] Badger SA, Jones C, McCaigue M, et al. Cytokine response to portal endotoxaemia and neutrophil stimulation in obstructive jaundice. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 24(1):25-32
- [3] ASSIMAKOPOULOS SF, VAGIANOS CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome[J]. *World J Gastroenterol*, 2009; 15(1):121-123
- [4] 刘福英, 刘田福. 实验动物学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2005: 209-210
- [5] 刘焯. PI3K/Akt 信号通路在右美托咪定对梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡中的作用[D]. 内蒙古医科大学, 2019
- [6] Lalisang T J, Sjamsuhidajat R, Siregar N C, et al. Profile of hepatocyte apoptosis and bile lakes before and after bile duct decompression in severe obstructive jaundice patients[J]. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2010; 9(5): 520-523
- [7] Rolo A P, Oliveira P J, Moreno A J, et al. Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy[J]. *Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2000; 57(1):177
- [8] Wu Q L, Shen T, Shao L L, et al. Ischemic postconditioning mediates cardioprotection via PI3K/GSK-3 β /I χ 2-catenin signaling pathway in ischemic rat myocardium[J]. *Shock*, 2012; 38(2): 165-169
- [9] 李达民, 关养时. 梗阻性黄疸致肝细胞凋亡的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2014; 23(7):967-971
- [10] Moazzam F N, Brems J J, Yong S L, et al. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis[J]. *Journal of the American College of Surgeons*, 2002; 194(6):731-739
- [11] Sheen-Chen S M, Ho H T, Lu C P, et al. The Effect of Insulin-like Growth Factor-I on Hepatocyte Apoptosis After Bile Duct Ligation in Rat[J]. *Digestive Diseases & Sciences*, 2006; 51(12):2220-2224
- [12] Wang J, Zou S. The bcl-2 mRNA expression in GCDC-induced obstructive jaundice in rats and its implication in hepatocellular apoptosis[J]. *华中科技大学学报: 医学英德文版*, 2002; 22(1):34-36
- [13] Tüfek A, Tokgöz O, Aliosmanoglu I, et al. The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. *International Journal of Surgery*, 2013; 11(1):96-100
- [14] Wu Gong-Jhe, Chen Jui-Tai, Tsai Hsiao-Chien, et al. Protection of Dexmedetomidine Against Ischemia/Reperfusion-Induced Apoptotic Insults to Neuronal Cells Occurs via an Intrinsic Mitochondria-Dependent Pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017; 18(22):1154-1156
- [15] Gao S, Wang Y, Zhao J, et al. Effects of dexmedetomidine pretreatment on heme-oxygenase-1 expression and oxidative stress during one-lung ventilation[J]. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2015; 8(3):3144-9

(上接第64页)

- [4] Clere-Jehl R, Schaeffer M, Vogel T, et al. Upper and lower gastrointestinal endoscopies in patients over 85 years of age: Risk-benefit evaluation of a longitudinal cohort[J]. *Medicine*, 2017; 96(44):e8439
- [5] 罗正武. 急诊胃镜检查对上消化道出血患者病因诊断及治疗转归分析[J]. *山西医药杂志*, 2018; 47(12):1418-1420
- [6] 中国医师协会急诊医师分会. 急性上消化道出血急诊诊治流程专家共识[J]. *中国急救医学*, 2015; 35(10):865-873
- [7] Viaspolli R, Malfertheiner P, Kandulski A. Helicobacter pylori and non-malignant upper gastrointestinal diseases[J]. *Helicobacter*, 2016; 21(S1):30-33
- [8] 王嫒嫒, 陈洪波. 2012~2014年邢台地区上消化道出血临床特征分析[J]. *医学临床研究*, 2016; 33(4):793-796
- [9] 安康, 陈倩倩, 李惠惠, 等. 75岁以上非静脉曲张性上消化道出血患者临床特点分析[J]. *解放军医学院学报*, 2016; 37(7):742-744, 749
- [10] Abougergi M S, Avila P, Saltzman J R. Impact of Insurance Status and Race on Outcomes in Nonvariceal Upper Gastrointestinal Hemorrhage: A Nationwide Analysis[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2019; 53(1):e12-e18
- [11] 杨辉, 金玉, 李玫, 等. 苏皖地区14岁以下儿童上消化道出血的临床和胃镜特征分析[J]. *中国内镜杂志*, 2016; 22(5): 52-56
- [12] Abougergi M S, Peluso H, Mrad C, et al. The Impact of Obesity on Mortality and Other Outcomes in Patients With Nonvariceal Upper Gastrointestinal Hemorrhage in the United States[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2019; 53(2):114-119
- [13] 胡越, 郑松柏. 老年人上消化道出血的临床特点[J]. *中华消化杂志*, 2018; 38(6):426-429
- [14] Laursen S B, Leontiadis G I, Stanley A J, et al. The use of selective serotonin receptor inhibitors (SSRIs) is not associated with increased risk of endoscopy-refractory bleeding, rebleeding or mortality in peptic ulcer bleeding[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017; 46(3):355-363
- [15] Laursen S B, Leontiadis G I, Stanley A J, et al. Relationship between timing of endoscopy and mortality in patients with peptic ulcer bleeding: A nationwide cohort study[J]. *Gastrointest Endosc*, 2017; 85(5):936-944