

丹参酮ⅡA联合右美托咪定通过 AMPK/ULK1 自噬通路减少肾缺血再灌注损伤作用的研究[△]

汤 霆*, 顾 晖, 张柏银, 唐吉伟[#] (湖南省脑科医院麻醉手术科, 湖南 长沙 410011)

中图分类号 R96;R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)09-1053-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.09.008

摘 要 目的:探讨丹参酮ⅡA联合右美托咪定通过 AMPK/ULK1 通路对肾缺血再灌注后细胞自噬与凋亡的影响。方法:选取健康 Wistar 雄性大鼠 50 只,随机均分为五组,即 A 组(丹参酮ⅡA+右美托咪定)、B 组(右美托咪定)、C 组(丹参酮ⅡA)、D 组(缺血再灌注模型组)和 E 组(假手术组)。采用夹闭双侧肾蒂 45 min 建立肾缺血再灌注模型。在缺血前 30 min, A 组大鼠腹腔注射丹参酮提取物+右美托咪定 25 μg/kg, B 组大鼠腹腔注射右美托咪定 25 μg/kg, C 组大鼠腹腔注射丹参注射液, D、E 组大鼠给予等量 0.9%氯化钠溶液。再灌注 24 h 后,采用苏木精-伊红染色法观察肾组织病理变化;采用免疫印迹法测定 AMPK、ULK1 的表达;取血标本测定血清肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素(IL)6 和 IL-10 水平。结果:A 组大鼠肾组织病理学改变较 D 组减轻。E 组大鼠细胞凋亡不明显;D 组大鼠可见大量的凋亡细胞和严重的组织损伤;A 组大鼠的组织损伤较轻,仅见散在的凋亡细胞;B、C 组大鼠组织损伤轻微,可见少量的凋亡细胞。与 D 组比较, A、B 和 C 组大鼠的凋亡指数明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 D 组比较, A 组大鼠肾组织中的 AMPK、ULK1 表达明显减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 B、C 和 D 组比较, A 组大鼠的 IL-6、TNF-α 水平明显降低,而 IL-10 水平明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:肾缺血再灌注时,丹参酮ⅡA联合右美托咪定能够减轻组织的炎症反应,减少肾脏细胞凋亡,缓解组织损伤,可能是通过 AMPK/ULK1 通路抑制自噬水平来实现的。

关键词 肾缺血再灌注损伤;丹参酮联合右美托咪定;自噬;炎症因子;细胞凋亡

Effects of Tanshinone II A Combined with Dexmedetomidine in Regulating Autophagy Levels Against Renal Ischemia Reperfusion Injury by AMPK/ULK1 Pathway[△]

TANG Ting, GU Hui, ZHANG Boyin, TANG Jiwei (Dept. of Anesthesiology and Surgery, Brain Hospital of Hunan, Hunan Changsha 410011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effects of tanshinone II A combined with dexmedetomidine on autophagy and apoptosis after renal ischemia reperfusion through AMPK/ULK1 pathway. **METHODS:** Fifty healthy male Wistar rats were randomly divided into five groups: group A (tanshinone II A + dexmedetomidine), group B (dexmedetomidine), group C (tanshinone II A), group D (ischemia reperfusion model) and group E (sham surgery group). The renal ischemia-reperfusion model was established by clamping the bilateral renal pedicles for 45 min. Before ischemia of 30 min, rats in group A were intraperitoneally injected with tanshinone extraction + 25 μg/kg dexmedetomidine, rats in group B were injected intraperitoneally with 25 μg/kg dexmedetomidine, rats in group C were injected intraperitoneally with Danshen injection, rats in group D and E were given the same amount of 0.9% sodium chloride solution. After reperfusion of 24 h, the pathological changes of renal tissue were observed by HE staining method; the expression of AMPK and ULK1 were determined by Western blot; blood samples were taken to determine serum tumor necrosis factor α(TNF-α), interleukin (IL) 6 and IL-10. **RESULTS:** The histopathological changes of rats in group A were lighter than those in group D. Apoptosis was not obvious in group E, a large number of apoptotic cells and severe tissue damages were observed in group D, and only scattered apoptotic cells were seen in group A with mild tissue damages. The tissue damages of rats in groups B and C were slight, and a small number of apoptotic cells were visible. Compared with group D, apoptosis index of rats in groups A, B and C decreased significantly, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with group D, the expression of AMPK and ULK1 in renal tissues of rats in group A rats decreased significantly, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with group B, C and D, the levels of IL-6 and TNF-α in group A decreased significantly, while

△ 基金项目:湖南省卫计委科研计划课题(No. B20190561, B20180714)

* 副主任医师。研究方向:临床麻醉、脏器功能保护。E-mail:364634584@qq.com

通信作者:副主任医师。研究方向:临床麻醉、脑保护。E-mail:tjwjtjw99@126.com

the levels of IL-10 increased significantly, with statistically significant difference ($P<0.05$). CONCLUSIONS: During renal ischemia reperfusion, tanshinone IIA combined with dexmedetomidine can reduce the tissue inflammation, decrease the renal cell apoptosis and alleviate the tissue damage, which may be achieved through inhibition of autophagy levels by AMPK/ULK1 pathway.

KEYWORDS Renal ischemia reperfusion; Tanshinone IIA combined with dexmedetomidine; Autophagy; Inflammatory factors; Cell apoptosis

肾缺血再灌注损伤可以导致原发性移植肾功能障碍,并且是肾移植早期失败的主要原因^[1]。因此,进一步深入研究肾缺血再灌注损伤的机制,对于临床上肾移植损伤的防治和相关理论研究有着重要意义。研究结果发现,细胞自噬在改善肾缺血再灌注损伤的病理过程中极为重要^[2]。传统中药丹参具有活血化瘀的功效,其主要有效成分为丹参酮IIA,丹参酮IIA被广泛应用于临床,对肾缺血再灌注损伤有一定的保护作用^[3]。右美托咪定为肾移植过程中常用的镇静镇痛药,研究结果显示,其在缺血再灌注损伤中具有一定的器官保护作用^[4-6]。但丹参酮IIA联合右美托咪定的抗肾缺血再灌注效应是否增强尚不清楚。本研究旨在探讨丹参酮联合右美托咪定通过单磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMPK)/Unc-51样自噬激活激酶1(ULK1)通路介导的自噬减轻肾缺血再灌注损伤的作用,现报告如下。

1 材料

1.1 仪器

DT2000型计算机图像采集分析系统(日本尼康公司);MS-TS型电子天平(中国上海第二天平仪器厂);3 cm无创动脉夹(上海医疗器械有限公司);H500型电子显微镜(日本日立公司);SD1型全自动生化测定仪(瑞士罗氏公司)。

1.2 药品与试剂

丹参酮IIA磺酸钠注射液(上海上药第一生化药业有限公司,规格为每支2 ml:10 mg,批准文号为国药准字H31022558);盐酸右美托咪定注射液[江苏恒瑞医药股份有限公司,规格为每支2 ml:200 μg(按右美托咪定计),批号为191011BP,批准文号为国药准字H20090248];2%戊巴比妥钠(0.015 ml/kg,湖南中医药大学实验室配制);抗β-actin兔多克隆抗体[圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司];白细胞介素(IL)10酶联免疫吸附试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司);AMPK一抗[圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司];ULK1一抗[圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司];肿瘤坏死因子α(TNF-α)酶联免疫吸附试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司);IL-6酶联免疫吸附试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型及分组

SPF级健康Wistar大鼠50只,体重200~250 g(湖南中医药大学动物中心提供),随机均分为五组:A组(丹参酮IIA+右美托咪定)、B组(右美托咪定)、C组(丹参酮IIA)、D组(缺血再灌注模型)和E组(假手术组)。五组大鼠称重后,采用苯巴比妥钠65 mg/kg腹腔注射麻醉后制备大鼠急性肾缺血再灌注

损伤模型。A、B、C和D组大鼠用无损伤血管夹阻断双侧肾蒂45 min,如果肾脏颜色先由鲜红色变苍白,再转为暗红色,则表明肾血管夹闭成功,同时用超声探头监测肾动脉血流情况。A、B和C组大鼠分别在缺血前30 min经腹腔注射丹参酮IIA注射液+右美托咪定25 μg/kg、右美托咪定25 μg/kg和丹参酮IIA注射液。D、E组大鼠给予等量0.9%氯化钠溶液。再灌注24 h后,取五组大鼠的肾组织和血标本。本研究方案已得到湖南省脑科医院伦理委员会批准。

2.2 观察指标

2.2.1 病理切片观察:经过脱水,石蜡包埋处理后,将肾组织切片3~4 μm,苏木精-伊红染色,光学显微镜下400倍观察,得出病理学结果。

2.2.2 细胞凋亡检测:细胞凋亡用TUNEL法检测。将3 μm厚度的肾组织石蜡切片进行脱蜡后,分别用核苷酸、TdT酶混合液、辣根过氧化物酶和蛋白酶K二抗孵育,DAB显色。阴性对照组是没有TdT酶的基液。细胞核呈棕黄色颗粒或棕褐色为TUNEL阳性反应。随机抽取每张切片的5个高倍视野(400倍),统计凋亡细胞数和细胞总数,根据公式计算凋亡指数(AI),AI=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

2.2.3 AMPK和ULK1蛋白表达的检测:取肾组织标本0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm,加入组织裂解液,离心20 min(6 000 r/min,离心半径10 cm),设定4℃、10 000 g,用上清液进行蛋白定量检测;接着进行SDS-PAGE蛋白电泳,将其转移至硝酸纤维素膜中;最后使用含5%脱脂乳的TBST溶液在室温(25℃)密封保存1 h,分别加入抗ULK1一抗和抗AMPK过夜,维持4℃,TBST洗膜3次各5 min,加入上述二抗室温孵育1 h,将抗β-actin兔多克隆抗体作为对照,在Smart Chemi ECL下显影并分析灰度值(ImageJ2X软件),以目的蛋白条带与对照(β-actin)蛋白条带的灰度值比值来反映ULK1和AMPK蛋白的表达水平。

2.2.4 细胞因子水平测定:将血标本2 ml于室温下静置30 min,离心5 min(6 000 r/min,离心半径10 cm),留血清。参照说明书,采用酶联免疫吸附法测定血清TNF-α、IL-6和IL-10水平。

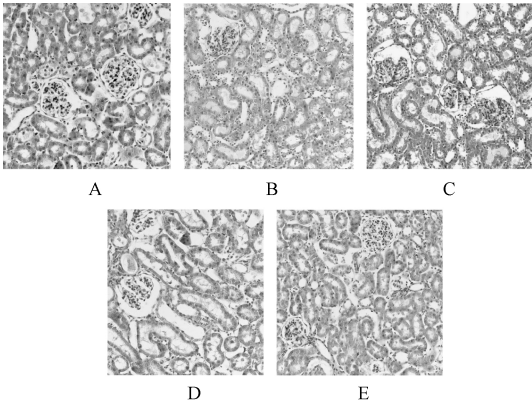
2.3 统计学方法

采用SPSS 24.0软件对本研究的数据进行分析,细胞凋亡数量、AMPK和ULK1蛋白表达的检测结果,血清TNF-α、IL-6和IL-10水平等计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验进行两样本的组间比较,如果 $P<0.05$,则认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肾组织病理学改变

A 组大鼠肾小管扩张程度和肾小管上皮细胞肿胀程度均不明显,肾小球改变不明显;B 组大鼠肾小球扩张程度轻,肾小管上皮细胞肿胀程度轻,肾小管扩张程度为中度;C 组大鼠肾组织病理学改变与 A 组类似;D 组大鼠肾组织则有明显病理变化,可见肾组织切片标本部分有凝固性坏死、脱落,光学显微镜下可见肾小球部分坏死,肾小管上皮细胞高度肿胀、变性,肾小管明显扩张,管壁增厚,管腔狭窄;E 组大鼠肾组织在光学显微镜下可见肾小管排列整齐,间质无充血水肿,见图 1。



A. A 组;B. B 组;C. C 组;D. D 组;E. E 组

A. group A; B. group B; C. group C; D. group D; E. group E

图 1 五组大鼠肾组织苏木精-伊红染色结果

Fig 1 HE staining of renal tissue of rats in five groups

3.2 细胞凋亡情况

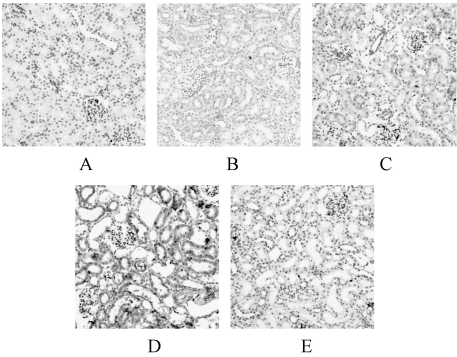
A、B、C、D 和 E 组大鼠细胞的 AI 分别为 (16. 87±3. 82) 、 (18. 34±4. 28) 、 (18. 61±3. 62) 、 (34. 75±6. 03) 和 (2. 78±0. 51) 。E 组大鼠细胞凋亡不明显;D 组大鼠可见大量的凋亡细胞和严重的组织损伤;A 组大鼠的组织损伤较轻,仅见散在的凋亡细胞;B、C 组大鼠组织损伤轻微,可见少量的凋亡细胞。与 E 组比较,A、B、C 和 D 组大鼠细胞的 AI 明显升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与 D 组比较,A、B 和 C 组大鼠细胞的 AI 明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。TUNEL 法检测的五组大鼠细胞凋亡情况见图 2。

3.3 AMPK 和 ULK1 蛋白表达

与 D 组比较,A 组大鼠肾组织中的 AMPK 及 ULK1 表达明显减少,差异有统计学意义 ($P<0.05$),且 A 组大鼠肾组织中的 AMPK 和 ULK1 表达较 B、C 组少 ($P<0.05$);与 E 组比较,A 组大鼠肾组织中的 AMPK 和 ULK1 表达较多,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。免疫印迹法检测的五组大鼠肾组织中 AMPK、ULK1 蛋白表达情况见表 1、图 3。

3.4 组织因子水平

与 E 组比较,A、B、C 和 D 组大鼠的炎症指标 (IL-10、IL-6 和 TNF- α) 水平均升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与 B、C 和 D 组比较,A 组大鼠的 IL-6、TNF- α 水平明显降低,IL-10 水平明显升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。



A. A 组;B. B 组;C. C 组;D. D 组;E. E 组

A. group A; B. group B; C. group C; D. group D; E. group E

图 2 TUNEL 法检测的五组大鼠细胞凋亡情况

Fig 2 Cell apoptosis detected by TUNEL method in five groups

表 1 五组大鼠肾组织中 AMPK、ULK1 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of AMPK and ULK1 protein expression in renal tissues of five groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	AMPK	ULK1
A 组	0.384±0.092	0.316±0.044
B 组	0.397±0.034 ^a	0.327±0.041 ^a
C 组	0.427±0.019 ^a	0.342±0.032 ^a
D 组	0.861±0.094 ^a	0.585±0.198 ^a
E 组	0.291±0.056 ^a	0.217±0.077 ^a

注:与 A 组比较, ^a $P<0.05$

Note: vs. group A, ^a $P<0.05$

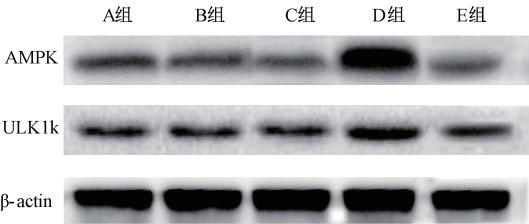


图 3 免疫印迹法检测的五组大鼠 AMPK、ULK1 蛋白表达情况

Fig 3 AMPK and ULK1 protein expression detected by Western blot in five groups

表 2 五组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of serum levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 among five groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF- α / (ng/ml)	IL-6 / (ng/L)	IL-10 / (ng/L)
E 组	9.55±1.54	31.03±5.89	62.56±11.83
A 组	14.48±2.93 ^a	39.97±6.17 ^a	123.34±27.63 ^a
B 组	30.22±4.28 ^{ab}	69.02±6.77 ^{ab}	83.22±21.78 ^{ab}
C 组	28.56±3.86 ^{ab}	70.10±6.72 ^{ab}	79.47±15.56 ^{ab}
D 组	45.48±3.92 ^{ab}	79.88±7.92 ^{ab}	91.68±19.32 ^{ab}

注:与 E 组比较, ^a $P<0.05$; 与 A 组比较, ^b $P<0.05$

Note: vs. group E, ^a $P<0.05$; vs. group A, ^b $P<0.05$

4 讨论

传统中药丹参通过独特的辨证治疗和多靶点机制发挥

护肾、改善气滞血瘀的功效。现代对丹参有较多的药理学研究。丹参酮是丹参的主要成分,丹参酮ⅡA注射液被广泛应用于临床,并且不良反应少。有研究结果认为,术前积极应用丹参酮ⅡA注射液可提高血清超氧化物歧化酶和血清谷胱甘肽过氧化物酶活性,有效改善术后肾缺血再灌注损伤,其机制是减少了缺血再灌注过程中产生的氧自由基从而减轻组织细胞的损伤^[7]。缺血再灌注损伤属于西医的概念,在中医的范畴中并没有提及,但从中医学角度来看,人的精神活动由五脏精气化生和充养,存储精气,若精气不足,则肾虚,缺血即所谓气血亏虚,肾精亏损。缺血再灌注后,因肾精气不足,气血的运行受阻,血瘀气滞。丹参具有活血化瘀之功效。五脏藏精气而不泄,以藏为贵。气血运行通畅,则气血满盈,肾精得藏而复其功用。众多研究结果表明,丹参在脑、心肌及肾缺血再灌注损伤等方面均有较好的疗效^[8-13]。可见丹参在活血化瘀通络方面发挥着重要作用,使脏得藏,腑得通,各得其用。

自噬是一种维持细胞内稳态和细胞完整性的“自我进食”过程。以微管相关蛋白轻链 3(LC3) I/Ⅱ和 Beclin1 的变化为特征的自噬功能障碍参与了各种肾损伤^[14]。通常通过测定自噬标志性指标来检测所有活细胞中自噬的动态过程,除了上述 2 个指标外,还包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1、AMPK 和 ULK1 复合物^[15]。据文献报道,活化的 AMPK 可磷酸化 ULK1,ULK1 作为调节自噬的关键分子,可提高 FUNDC1 与 LC3 结合的效率^[16]。提示 AMPK 可能通过上游起始蛋白 ULK1 的调节作用从而发挥细胞自噬功能。自噬与细胞凋亡有着密切关系。在某些情况下,上调自噬能抑制细胞凋亡^[17];而抑制自噬则能导致细胞凋亡^[18]。相关研究结果揭示了自噬与炎症因子的关系,细胞因子的转录、调控和分泌在某种程度上受自噬的直接影响^[19]。以上研究结果表明,自噬作用可能减轻炎症因子的释放,从而减轻肾缺血再灌注损伤。

本研究结果发现,肾缺血再灌注导致自噬关键分子 AMPK 和 ULK1 表达升高,IL-6、TNF-α 表达增强,IL-10 表达轻度升高;丹参酮ⅡA 联合右美托咪定降低了 AMPK 和 ULK1 的表达及其磷酸化,抑制了炎症因子 IL-6、TNF-α 的表达,同时大幅增加了抗炎因子 IL-10 的表达。由此推断,肾缺血再灌注时,使用丹参酮ⅡA 联合右美托咪定对肾功能有保护作用,可能是通过调控 AMPK/ULK1 信号通路,进而调控炎症相关因子(TNF-α、IL-6 和 IL-10)的表达水平,减轻组织一系列连锁炎症反应,抑制细胞凋亡,从而减少肾组织病理学改变,最终缓解肾功能损害。

参考文献

[1] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.
[2] Xie Y, Jiang D, Xiao J, et al. Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion-induced kidney injury by activating autophagy

via the SGK1 signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 338.
[3] 陈晓宇, 席加喜, 叶冬梅. 丹参酮ⅡA 治疗肾损伤临床应用的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2018, 11(3): 302-306.
[4] 项冰倩, 罗梓垠, 高慧, 等. 右美托咪定对肺缺血再灌注小鼠的心肌保护作用: 与内质网应激的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(1): 61-65.
[5] Alam A, Suen KC, Hana Z, et al. Neuroprotection and neurotoxicity in the developing brain: an update on the effects of dexmedetomidine and xenon[J]. Neurotoxicol Teratol, 2017, 60: 102-116.
[6] Liu Y, Sheng B, Wang S, et al. Dexmedetomidine prevents acute kidney injury after adult cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. BMC Anesthesiol, 2018, 18(1): 7.
[7] 刘宁, 谢斌. 丹参酮ⅡA 注射液在独肾肾结石术中减轻肾缺血-再灌注损伤的作用探讨[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(11): 1515-1516, 1518.
[8] 赵丽萍, 张琳成, 陈冰, 等. 丹参酮ⅡA 对脑缺血再灌注损伤大鼠神经保护作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2082-2085.
[9] 宋金军, 周竹晨, 陈冰, 等. 丹参与红花水溶性成分配伍抗大鼠脑缺血再灌注损伤的作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1616-1619.
[10] 冯敏, 王丽蕊, 徐大千. 丹参对大鼠心肌缺血再灌注损伤后心律失常的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(23): 5791-5793.
[11] 陈少秀, 张秋芳, 何华琼. 丹参酮ⅡA 保护大鼠肾移植术后缺血再灌注损伤的机制研究[J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(1): 21-24.
[12] 沈婉丽, 于飞, 徐璐, 等. 丹参酮ⅡA 衍生物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药学(英文版), 2018, 27(1): 1-13.
[13] 丁华胜, 王永剑, 黄忠毅. 丹参酮ⅡA 对大鼠心肌缺血再灌注损伤中 HMGB1, IL-1β 表达及 SOD 水平的影响[J]. 中国中医急症, 2020, 29(5): 776-778, 801.
[14] Sun H, Zou S, Candiotti KA, et al. Octreotide Attenuates Acute Kidney Injury after Hepatic Ischemia and Reperfusion by Enhancing Autophagy[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42701.
[15] Han F, Xiao QQ, Peng S, et al. Atorvastatin ameliorates LPS-induced inflammatory response by autophagy via AKT/mTOR signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(2): 1604-1615.
[16] Wu W, Tian W, Hu Z, et al. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy[J]. EMBO Rep, 2014, 15(5): 566-575.
[17] 刘雪, 石星星, 李项瑞, 等. 上调自噬抑制 LPS 诱导的小胶质细胞死亡[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(1): 23-28.
[18] 李世朋, 王振, 何金丹, 等. 干扰素 γ 抑制自噬诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(4): 343-346.
[19] Fan XY, Tian C, Wang H, et al. Activation of the AMPK-ULK1 pathway plays an important role in autophagy during prion infection[J]. Sci Rep, 2015, 5: 14728.

(收稿日期: 2021-05-27)