

## 右美托咪定激活 PI3K/Akt 通路改善 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤实验研究

陈胜阳, 张永强, 刘 俊, 刘国泽, 田建民, 岳修勤

新乡医学院第一附属医院 麻醉科, 河南 新乡 453100

**摘要:**目的 考察右美托咪定(Dex)对脂多糖(LPS)诱导的大鼠急性肺损伤(ALI)的影响,并探讨可能与 PI3K/Akt 信号通路改变的相关机制。方法 将 80 只 SD 大鼠根据建模方法随机分为 5 组:对照组、模型组、Dex 低剂量组、Dex 高剂量组、Dex+LY294002 组,建模 24 h 时处死并分离肺组织,观察组织病理切片,检查肺水肿程度及微血管通透性,采用 Western blotting 法检测 Akt 及其磷酸化蛋白以及线粒体凋亡信号相关蛋白的表达水平,检查线粒体细胞色素 C、膜电位及 ATP 含量,并用电镜观察线粒体形态,采用流式细胞术检测肺组织细胞凋亡情况,采用 DCFH-DA 探针荧光显微镜法检测细胞内的活性氧(ROS)水平。结果 LPS 滴注 24 h 后,病理切片表现有明显的 ALI 特征,Dex 在 50  $\mu$ g/kg 剂量时可明显改善 LPS 诱导的 ALI 病理特征;以对照组为参照,p-Akt(Thr308)与 p-Akt(Ser473)的相对表达量模型组未发生明显变化,Dex 组则均显著增高( $P<0.001$ ),在 Dex+LY294002 组的表达水平较 Dex 组显著降低( $P<0.001$ );模型组的 Bax 与 Bcl-2 蛋白较对照组的相对表达量分别显著升高与降低( $P<0.001$ ),Dex 组分别降低与升高至接近对照组水平,Dex+LY294002 组又分别回升与回降;对照组、模型组、Dex 组、Dex+LY294002 组的肺组织细胞凋亡率分别为 2.4%、19.5%、6.7%、13.1%;各组的 ROS 水平变化与肺组织细胞凋亡情况一致性良好。结论 Dex 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻 LPS 诱导的肺组织细胞凋亡及线粒体凋亡信号激活,继而改善 ALI,发挥肺保护作用。

**关键词:** 右美托咪定;急性肺损伤;PI3K/Akt 通路;细胞凋亡

中图分类号: R974 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)11-2123-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.11.003

## Experimental study of dexmedetomidine activating PI3K/Akt pathway to improve LPS-induced acute lung injury in rats

CHEN Sheng-yang, ZHANG Yong-qiang, LIU Jun, LIU Guo-ze, TIAN Jian-min, YUE Xiu-qin

Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of dexmedetomidine (Dex) on LPS-induced acute lung injury (ALI) in rats, and to explore the possible mechanism of PI3K/Akt signaling pathway changes. **Methods** Eighty SD rats were randomly divided into five groups: control group, model group, Dex low-dose group, Dex high-dose group and Dex + LY294002 group. After 24 h of modeling, the lung tissues were separated. Histopathological sections were observed to examine the degree of pulmonary edema and microvascular permeability. Western blotting was used to detect the expression of Akt, its phosphorylated protein and mitochondrial apoptotic signal-related protein. The levels of cytochrome C, membrane potential and ATP in mitochondria were examined. The morphology of mitochondria was observed by electron microscopy. The apoptosis of lung cells was detected by flow cytometry. The ROS level in cells was detected by DCFH-DA probe fluorescence microscopy. **Results** After 24 h of LPS infusion, the pathological sections showed obvious ALI characteristics. Dex could significantly improve the pathological characteristics of LPS-mediated ALI at the dose of 50  $\mu$ g/kg. Compared with the control group, the relative expression of p-Akt (Thr308) and p-Akt (Ser473) did not change significantly in model group, but increased significantly in Dex group ( $P<0.05$ ), and the expression level of p-Akt (Thr308) and p-Akt (Ser473) in Dex + LY294002 group was significantly lower than that in the Dex group ( $P<0.05$ ). The relative expression of Bax and Bcl-2 protein in model group was significantly higher and lower than that in control group ( $P<0.05$ ). The expression of Bax and Bcl-2 protein in Dex group was lower and higher than that in model group, while that in Dex +LY294002 group was higher and lower. The apoptotic rates of lung tissue in control group, model group, Dex group and Dex +LY294002 group were 2.4%, 19.5%, 6.7% and 13.1% respectively, the changes of ROS levels in each group were

收稿日期: 2020-07-15

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(2018020351)

作者简介: 陈胜阳(1977—),男,副主任医师,硕士,研究方向为脏器保护。E-mail: plaa2398@163.com

in good agreement with the apoptosis of lung cells. **Conclusion** Dex can alleviate LPS-mediated apoptosis of lung tissue and mitochondrial apoptosis by activating PI3K/Akt signaling pathway, and then improve ALI to play a protective role in lung.

**Key words:** dexmedetomidine; acute lung injury; PI3K/Akt pathway; cell apoptosis

内毒素诱发脓毒症时易造成内脏损伤,其中肺脏往往是最先遭受攻击的靶器官,发生率可达 83%~100%,后续可继发急性肺损伤(ALI)。在众多临床综合征中脓毒症所致 ALI 颇具威胁性,其病死率高过心肌梗死,是当前 ICU 非心脏疾病致死以及中后期重症患者死亡的主要原因。尽管国内外学者围绕该疾病进行了大量的研究,但迄今为止其病死率仍高达 35%~40%,故深入研究脓毒症致 ALI 的防治措施具有重要临床意义<sup>[1]</sup>。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)作为一条经典的胞内信号通路,在激活后可基于多方面机制对细胞凋亡产生影响<sup>[2-3]</sup>。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)属高选择性的  $\alpha_2$  受体激动剂,临床上常被作为麻醉辅助药物而广泛用于围术期镇静与镇痛。近年来大量研究表明 Dex 具有多脏器保护作用,如有助于脂多糖(LPS)诱导的 ALI 的改善<sup>[4]</sup>,但机制尚不十分明确。本研究通过对小鼠气管内滴注 LPS 制备 ALI 模型,旨在观察 Dex 在该病理过程中的肺保护作用及可能与 PI3K/Akt 信号通路改变的相关机制,继而为 ALI 的预防及早期诊治提供实验及理论依据。

## 1 材料

80 只 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 180~220 g,由郑州大学实验动物中心提供,动物质量合格证号:41003100003162;动物生产许可证号:SCXK(豫)2015-0004。LPS,美国 Sigma 公司,批号 L2880;Dex,上海陶术生物科技有限公司,批号 113775-47-6;LY294002(PI3K 抑制剂),美国 Promega 公司,批号 154447-36-6;伊文思蓝(EB)试剂盒购自 Sigma 公司;细胞色素 C 抗体和 MitoTracker 探针(CMXRos)购自美国 Sigma 公司;ATP 生物发光检测试剂盒购自英国 Abcam 公司;精密电子秤,型号 ME802E,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;共聚焦显微镜,型号 STELLARIS,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;酶标仪,型号 Synergy LX,美国 BioTek 公司;光学显微镜,型号 GL99T,上海维翰光电科技有限公司;透射电子显微镜,型号 JEM-F200,日本电子株式会社。

## 2 方法

### 2.1 实验分组、建模与给药

大鼠随机分为 5 组:对照组 17 只,气管内滴入

等量生理盐水;模型组 17 只,气管内滴入 LPS (5 mg/kg);Dex 低、高剂量组各 17 只,分别在气管内滴入 LPS 前以尾静脉泵入 Dex 10、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  预处理;Dex+LY294002(PI3K 抑制剂)组 12 只,在气管内滴入 LPS 前以尾静脉泵入 Dex 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + LY294002 0.3 mg/kg 预处理。所有大鼠在建模 24 h 时处死,并分离肺组织。除 Dex+LY294002 组外,其余各组在处死 30 min 前随机取 5 只大鼠,通过尾 iv 20 mg/kg 1% EB,检查微血管通透性。

### 2.2 肺组织病理学观察

将右肺叶进行病理组织切片,采用 4%多聚甲醛固定,72 h 后常规酒精脱水及石蜡包埋,HE 染色后进行高倍( $\times 400$ )光学显微镜观察。每一切片均随机选取 3 个视野。参考 Chang 等<sup>[4]</sup>方法进行肺损伤评分:以炎症及中性粒细胞浸润程度为主要评分依据,评分最低 0 分,最高 5 分,其中 0 分表示正常,1 分表示最小( $<1\%$ ),2 分表示轻微( $1\% \sim 25\%$ ),3 分表示温和( $26\% \sim 50\%$ ),4 分表示中、重度( $51\% \sim 75\%$ ),5 分表示极严重( $76\% \sim 100\%$ )的肺损伤。

### 2.3 肺水肿程度及微血管通透性检查

采用肺湿质量/干质量(W/D)对肺水肿程度进行评估,用精密电子秤检查不同刺激后的 W/D 变化。取左肺下叶吸干,称质量,数值作为湿肺质量(W),放置到 80  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干 48 h,取出称质量,数值作为干质量(D),计算 W/D。微血管通透性采用 EB 法进行检查,将处死前 30 min 注射 EB 的大鼠,处死后快速开胸,并将左心耳剪开,采用等量压生理盐水经肺动脉圆锥对肺部进行冲洗,直到左心耳有清凉液体流出,肺组织 EB 采用甲酰胺进行提取,以酶标仪检测 620 nm 处吸光度(A)值,计算肺干组织的 EB 含量。

### 2.4 Western blotting 检测

常规提取肺组织蛋白与细胞质蛋白,前者用于 Akt 及其磷酸化蛋白表达的检测,后者用于线粒体凋亡信号相关蛋白的检测。(1)Akt 及其磷酸化蛋白表达的检测:常规完成总蛋白质量浓度测定,取 50  $\mu\text{g}$  进行 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转至 NC 膜后采用 TBST(含 10 g/L BSA)室温封闭 1 h;分别将兔抗人 Akt、p-Akt(Ser473)和 p-Akt(Thr308)

抗体按 1:600 比例稀释后加入, 室温孵育 2 h; TBST 漂洗 3 次, 10 min/次; 碱性磷酸酶标记二抗, 按 1:7 500 比例稀释后加入, 室温孵育 1 h; 同前法漂洗后再采用 TBS 漂洗 2 次, 最后进行 NBT/BCIP 显色, 去离子水漂洗, 取像。(2) 线粒体凋亡信号相关蛋白表达的检测: 常规完成总蛋白质量浓度测定, 在蛋白上清中加入 5×蛋白上样缓冲液, 98.5 °C 变性处理 5 min 后分装, 放置到-80 °C 冰箱; 采用 5% 积层胶和 15% 的分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜后漂洗 3 次, 5 min/次, 采用 5% BSA 室温摇床封闭 2 h, 分别加入 Bax、Bcl-2、Cytochrome C、cleaved Caspase-3 抗体后在 4 °C 温度条件下过夜; PVDF 膜室温下摇床复温 1 h, TBST 漂洗 3 次, 5 min/次; 将辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联二抗 (1:2 000) 加入, 室温孵育 1 h 后 TBST 漂洗 4 次, 10 min/次, 将 PVDF 膜取出并用滤纸吸干, 加 ECL 发光液后避光孵育 1 min, 曝光拍照。最后均采用 Image J 软件进行灰度分析。

## 2.5 线粒体细胞色素 C 与膜电位检测、电镜形态观察及 ATP 含量检测

参考文献方法<sup>[5]</sup>, 采用细胞色素 C 抗体和 MitoTracker 探针 (CMXRos) 双重标记线粒体, 采用共聚焦显微镜观察不同组的荧光变化, 其中 MitoTracker 探针其染料的积累取决于膜电位; 采用 ATP 生物发光检测试剂盒检测 ATP 含量。采用透射电子显微镜观察各组样本的线粒体形态<sup>[8]</sup>。

## 2.6 肺组织细胞凋亡的流式细胞仪检测

取左肺上部组织制备肺全细胞悬液, 用无菌 PBS 清洗肺组织表面的血液及血凝块, 把肺组织转移至平皿中, 使用眼科剪将组织剪碎; 转移至装有 6 mL 消化液 (PBS 中含 0.3% 的 I 型胶原蛋白酶) 的 15 mL 离心管中, 将此离心管放至 37 °C 水浴摇床中消化 45 min, 将消化液通过 200 μm 的细胞筛将消化下来的细胞液收集到 1 个离心管中, 并 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 并使用 10 mL PBS (含

2% 小牛血清) 清洗 1 次, 然后使用 2 mL PBS 重悬细胞, 并冰浴保存; 将未消化完的肺组织从细胞筛转移至 6 mL 消化液中继续消化, 直至肺组织只剩余支气管结构; 将收集到的所有细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 使用 3 mL 红细胞裂解液重悬细胞, 室温裂解 3 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 使用 10 mL 的 PBS (含 2% 小牛血清) 重悬细胞, 若细胞发红则再次裂解 1 次, 直至液体不发红; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 尽量弃净, 加入含 1% 小牛血清的 4 °C PBS 2 mL 得到大鼠肺单细胞悬液。最后进行流式细胞仪检测, 观察各组细胞凋亡情况, 并在流式二维图中计算凋亡率。

## 2.7 细胞 ROS 水平检测

采用 DCFH-DA 探针荧光显微镜法进行检测。用无血清培养液稀释 DCFH-DA (1:1 000), 同时取上述大鼠单细胞悬液用稀释过的 DCFH-DA 将悬浮细胞浓度稀释至  $1 \times 10^6$  /mL, 在 37 °C 细胞培养箱中孵化 20 min, 用无血清培养液常规洗涤以去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 利用荧光显微镜分别检测绿光、白光条件下的荧光强度, 拍照观察。

## 2.8 统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 多重比较。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 组织病理学观察结果

对照组大鼠肺组织未见炎症细胞浸润; 模型组大鼠肺组织见大量炎症细胞浸润, 同时伴明显肺泡结构破坏、肺泡壁增厚及出血; Dex 低剂量组见上述症状有所改善, 但不十分明显; Dex 高剂量组见少量炎症细胞浸润, 肺泡结构尚完整。见图 1。模型组大鼠的肺组织损伤评分较对照组显著升高 ( $P < 0.001$ ), Dex 低、高剂量组大鼠的肺组织损伤评分较模型组依次降低。见图 2。

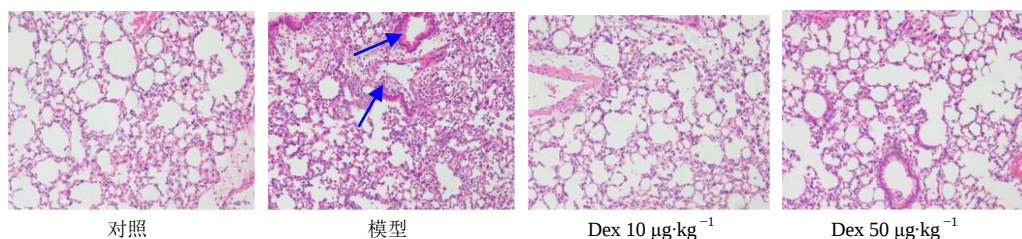
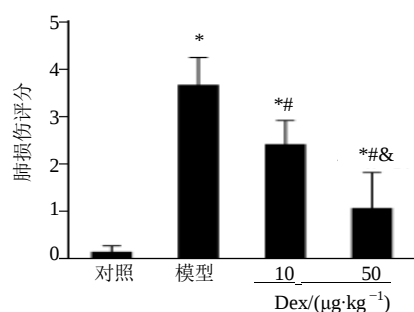


图 1 各组大鼠肺组织病理学观察结果

Fig. 1 Results of pathological changes of lung tissue of rats in each group



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与 Dex 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组比较: & $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs Dex 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  group

图2 Dex 对 LPS 诱导的肺组织病理损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

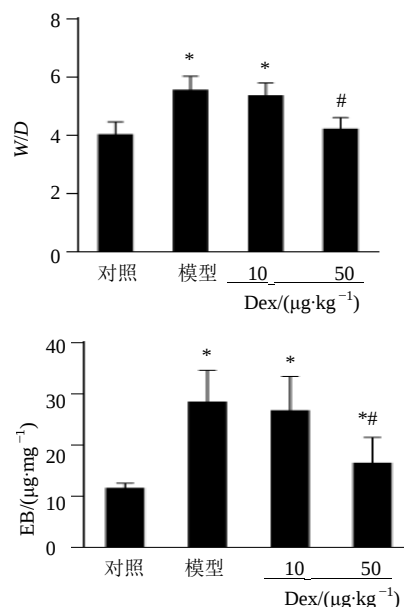
Fig. 2 Effect of Dex on LPS-induced pathological damage of lung tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 3.2 肺水肿程度及微血管通透性检查结果

各组的  $W/D$  检测结果见图 3, 模型组与 Dex 低剂量组大鼠  $W/D$  均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), Dex 高剂量组显著低于模型组与 Dex 低剂量组 ( $P < 0.05$ ), 与对照组比较无明显差异。各组大鼠肺组织中的 EB 含量检测结果见图 3, 组间差异情况与肺水肿基本类似。

### 3.3 Dex 对 Akt 磷酸化蛋白表达的影响

以对照组为参照, 模型组大鼠肺组织中的 p-Akt (Thr308) 和 p-Akt (Ser473) 相对表达量与



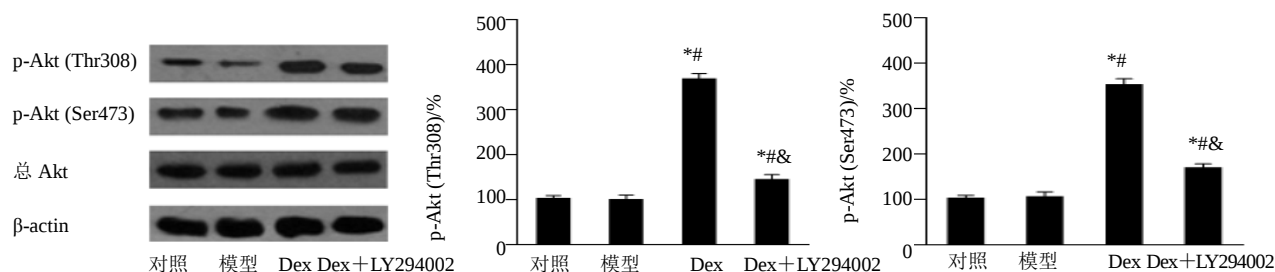
与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group

图3 Dex 对 LPS 诱导的肺水肿及微血管通透性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Effect of Dex on LPS-induced pulmonary edema and microvascular permeability of lung tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

对照组无明显差异, Dex 组大鼠肺组织中的 p-Akt (Thr308) 和 p-Akt (Ser473) 相对表达量较模型组显著升高, Dex + LY294002 组大鼠肺组织中的 p-Akt (Thr308) 和 p-Akt (Ser473) 相对表达量较 Dex 组显著降低。见图 4。



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与 Dex 组比较: & $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs Dex group

图4 Dex 对 ALI 大鼠肺组织 p-Akt (Thr308) 和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 4 Effect of Dex on protein expression of p-Akt (Thr308) and p-Akt (Ser473) in lung tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 3.4 Dex 对 LPS 诱导的线粒体损伤及凋亡信号的影响

线粒体经细胞色素 C 抗体和 MitoTracker 探针双重标记后, 对照组细胞显示完整的线粒体细胞色素 C 染色 (绿色) 和 CMXRos (红色), 模型组荧光严重丧失, Dex 组荧光获得恢复, Dex + LY294002

组荧光减弱; 线粒体形态的电镜观察结果显示, LPS 导致线粒体膜和嵴结构遭到明显破坏, Dex 可减弱破坏程度, 见图 5; ATP 含量检测结果显示, 与对照组比较, 模型组 ATP 相对含量显著降低, Dex 组 ATP 相对含量较模型组显著升高, Dex + LY294002 组复降至接近模型组, 见图 5。Western blotting 检测结果

显示,以对照组为参照,模型组细胞内 Bax 蛋白相对表达量显著增加, Dex 组细胞内 Bax 蛋白相对表达量较模型组显著降低, Dex+LY294002 组细胞内 Bax 蛋白相对表达量较 Dex 组有所升高;以对照组为参照,模型组细胞内 Bcl-2 蛋白相对表达量显著降低,

Dex 组细胞内 Bcl-2 蛋白相对表达量较模型组显著升高, Dex+LY294002 组细胞内 Bcl-2 蛋白相对表达量较 Dex 组又有所降低; Cytochrome C 相对含量和 cleaved Caspase-3 相对含量各组变化趋势与 Bax 蛋白相似。结果见图 6。

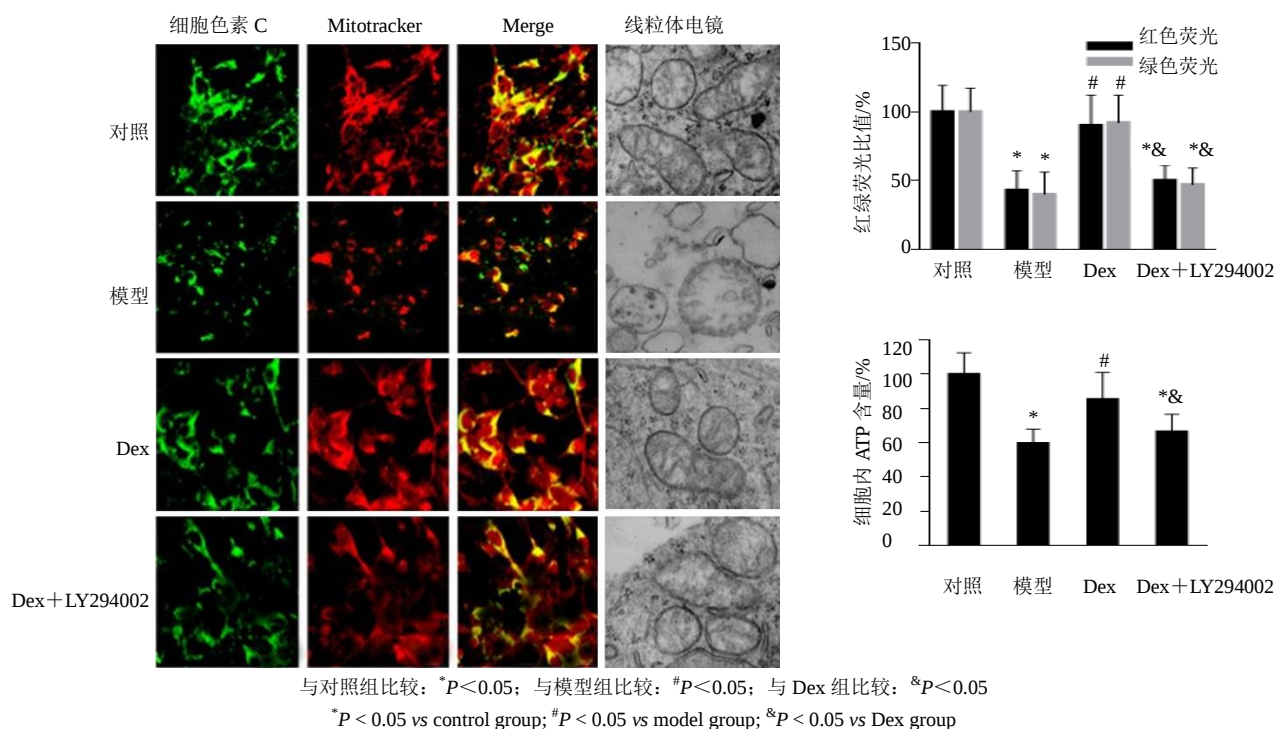


图 5 Dex 对 ALI 大鼠肺组织线粒体损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 5 Effect of Dex on injury of mitochondrion in lung tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

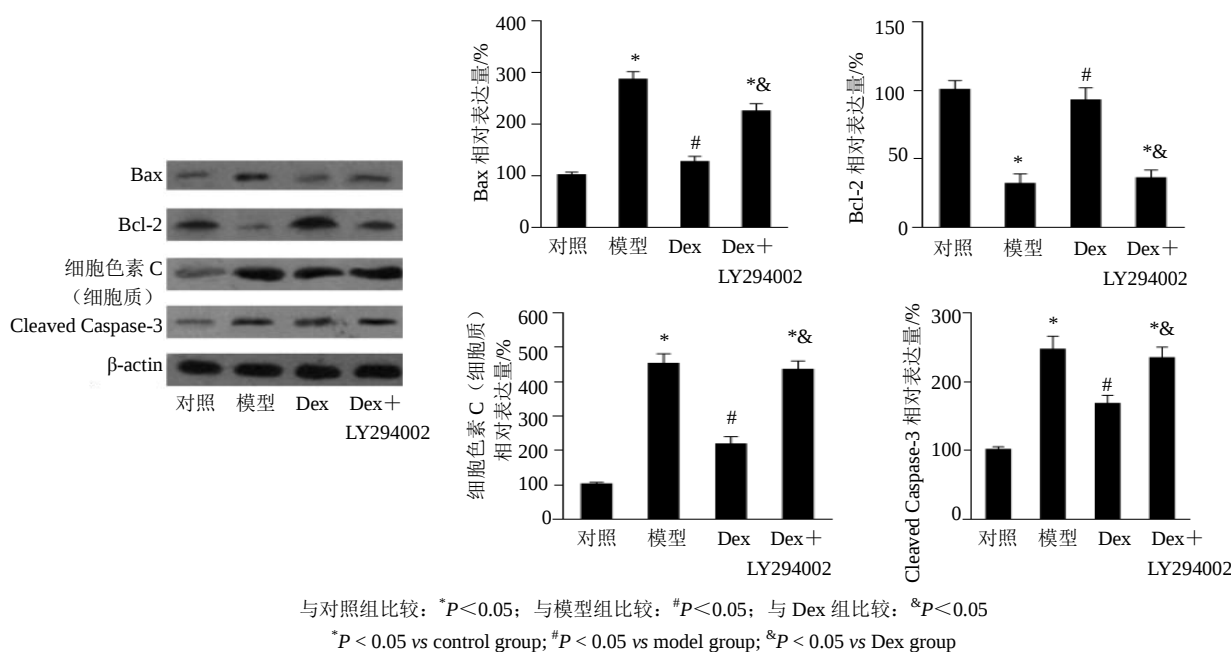


图 6 Dex 对 ALI 大鼠肺组织 p-Akt (Thr308) 和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 6 Effect of Dex on protein expression of p-Akt (Thr308) and p-Akt (Ser473) in lung tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 3.5 Dex 对肺组织细胞凋亡及 ROS 水平的影响

流式细胞仪检测结果显示, 对照组、模型组、Dex 组、LY294002 组的肺组织细胞凋亡率分别为 2.4%、19.5%、6.7%、13.1%; ROS 水平检测, 利

用荧光显微镜分别检测绿光、白光条件下的荧光强度, 模型组细胞内的 ROS 水平显著升高, Dex 组较模型组显著降低, Dex+LY294002 组明显复升。见图 7。

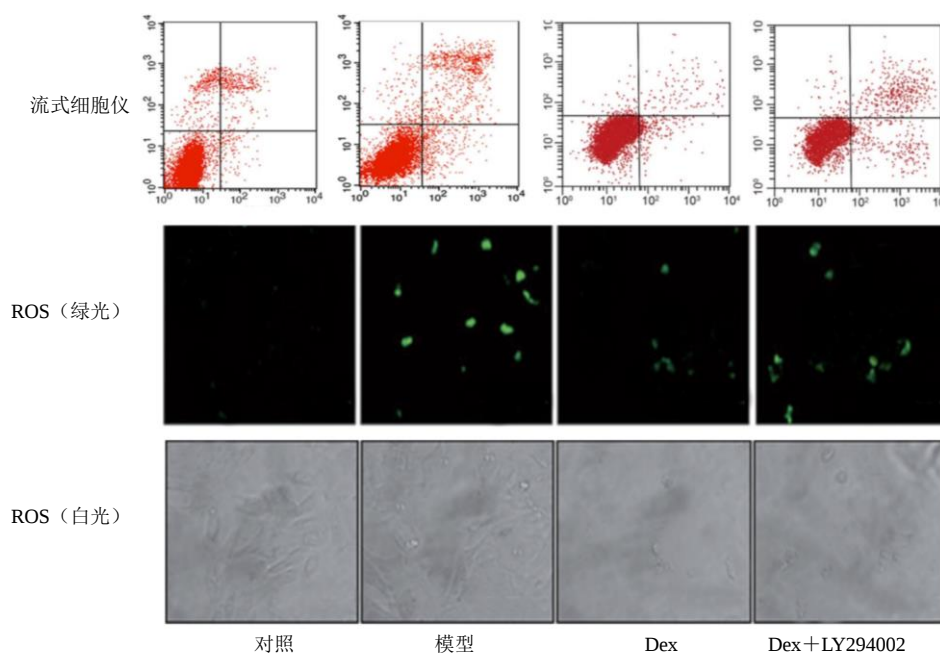


图 7 Dex 对 ALI 大鼠肺组织细胞凋亡和 ROS 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 7 Effect of Dex on apoptosis and ROS of cells in lung tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

## 4 讨论

脓毒症导致的 ALI 病理多表现为大量中性粒细胞浸润、前炎症细胞因子的释放及肺毛细血管内皮细胞与肺泡上皮细胞屏障遭到破坏, 从而导致肺水肿程度加重及肺泡-毛细血管屏障通透性增加。气管腔内滴注 LPS 为一种经典的 ALI 大鼠模型建立方法, 本研究观察到在 LPS 滴注 24 h 后, 出现有大量炎症细胞浸润, 同时伴明显肺泡结构破坏、肺泡壁增厚及出血等特征, 同时肺水肿与微血管通透性均显著增加, 提示 ALI 大鼠模型建模成功。同时该部分实验也表明, Dex 在 50  $\mu\text{g/kg}$  剂量时可明显改善 LPS 介导的 ALI 病理特征。近年来大量研究表明 Dex 具有器官保护作用, 其肺保护机制可能与其能降低炎症反应<sup>[7]</sup>、抗氧化应激<sup>[8]</sup>、抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>、上调 AQP1 和 AQP5 减轻肺水肿<sup>[10]</sup>、抑制中性粒细胞聚集<sup>[11]</sup>与巨噬细胞激活<sup>[12]</sup>等多方面因素有关。PI3K/Akt 信号通路对细胞凋亡发挥重要作用, 故本研究拟从抑制细胞凋亡角度探讨 Dex 对 ALI 的保护作用, 并尝试与 PI3K/Akt 信号通路的改变建立联系。

PI3K 是磷脂激酶的重要家族成员之一, 兼具有脂类与蛋白 2 类激酶的生物活性, 是当前已获相对较深入研究的重要胞内传导分子<sup>[13]</sup>。PI3K 其下游分子 Akt 在调控细胞增殖、生长与存活等方面均发挥有重要作用, 同时 Akt 在多条细胞信号通路中均扮演了重要角色<sup>[14]</sup>。在 PI3K/Akt 通路中, Akt 与 PI3K 结合后其 2 个位点 Thr308 与 Ser473 将被磷酸化, 继而激活 Akt 的生物学效应<sup>[15-16]</sup>。Markou 等<sup>[3]</sup>发现大鼠体外循环 (CPB) 后肺损伤时 PI3K/Akt 信号通路发生明显改变; Lai 等<sup>[17]</sup>发现在增强 Akt 表达后, 小鼠肺损伤模型肺泡上皮细胞核内皮细胞的损伤程度将被减轻, 且个体生存率得以提高; Zhao 等<sup>[18]</sup>研究表明, 在 LPS 诱导的 ALI 动物模型中, 另一种麻醉药物七氟烷也能激活 PI3K/Akt 信号通路增加 p-Akt 蛋白表达继而减轻 ALI; Zhang 等<sup>[19]</sup>的研究已明确在大鼠肺缺血再灌注损伤过程中, Dex 能激活肺组织 PI3K/Akt 信号通路从而发挥肺保护作用。本实验结果显示: 以对照组为参照, p-Akt (Thr308) 与 p-Akt (Ser473) 的相对表达量模型组未发生明显变化, Dex 组则均显著增高, 结合病理

切片的观察结果,推测 Dex 可能通过增加 p-Akt 在肺组织中的表达而减轻 LPS 介导的肺损伤;另外二者在 Dex+LY294002 组的表达水平较 Dex 组显著降低,提示 LY294002 作为一种 PI3K 抑制剂,可通过抑制 Akt 的表达抵消 Dex 的肺保护的效应,同时也验证了 Dex 改善 LPS 介导 ALI 是通过激活 PI3K/Akt 通路实现的。

细胞凋亡是一种为维持机体内环境稳定并由基因控制的程序化细胞死亡。相关研究表明,在 ALI 的发病过程中细胞凋亡发挥了相当重要的作用<sup>[20]</sup>。较容易观察或推测到的是,在 ALI 早期发病过程中,肺泡上皮出现 I 型细胞的凋亡将导致膜屏障功能丧失;而 II 型细胞的凋亡将导致肺泡表面活性物质分泌减少,继而导致肺泡萎陷及肺水肿程度增加。本研究采用流式细胞仪检测结果显示,模型组的肺组织细胞凋亡率从对照组的 2.4% 显著升高到 19.5%,而 Dex 的应用则使其降低至 6.7%,说明 Dex 对细胞凋亡发挥了抑制作用。此外,线粒体在细胞凋亡中也扮演了重要角色,在多种细胞凋亡过程中均能观察到线粒体膜电位下降,在此之后细胞将发生不可逆凋亡<sup>[21]</sup>;同时线粒体肿胀裂解伴随大量释放细胞色素 C,导致经细胞色素 C 抗体和 MitoTracker 探针双重标记的线粒体荧光丧失。同时其变化特征与 ATP 含量变化基本一致。

为进一步验证,本研究对定位于线粒体的 Bax、Bcl-2、Cytochrome C、cleaved Caspase-3 等相关蛋白的表达进行了检测。基于在结构与功能上的差异,Bcl-2 家族蛋白被分作 2 大类,分别发挥抗、促凋亡作用。其中,抗凋亡蛋白主要包括 Bcl-2 与 Bcl-x1 等,促凋亡蛋白主要包括 Bad、Bax 及 Bid 等。Bad 的 Ser126/Ser112 残基磷酸化发生于 Akt 激活后,接着再与 Bcl-2 或 Bcl-x1 解聚并与抗凋亡蛋白 14-3-3 结合,这最终导致 Bad 具有促凋亡生物效应,而 Bcl-2 在游离状态下即可发挥抗凋亡作用<sup>[22]</sup>。Bax 也能在其 Ser184 位点磷酸化后发挥促凋亡的负调控作用<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,模型组的 Bax 与 Bcl-2 蛋白较对照组的相对表达量分别显著升高与降低,Dex 组分别降低与升高至接近对照组水平,Dex+LY294002 组又分别回升与回降。细胞色素 C 从线粒体内释放到细胞质被认为是细胞凋亡的关键环节;Caspase-3 为一种凋亡执行因子。Cyt-C 从线粒体释放后与细胞凋亡激活因子 1 (Apaf-1) 结合,Caspase-9 前体被活化,进而激活 Caspase-3,引发

caspases 级联反应,从而诱发细胞凋亡<sup>[24]</sup>。以上结果表明 Dex 可能通过激活 PI3K/AKT 通路抑制 Bax 表达上调并增加 Bcl-2 表达,从而导致线粒体凋亡信号的激活被抑制。ROS 主要产生于线粒体,在线粒体损伤的发生及其相关凋亡信号的激活过程中,均涉及氧化应激效应<sup>[25]</sup>。相关研究表明 Bcl-2 作用位点既是 ROS 产生的部位,也是 ROS 作用的部位<sup>[28]</sup>。故检查 ROS 水平能侧面反映线粒体损伤及凋亡信号激活情况,本研究结果显示各组的 ROS 水平变化与肺组织细胞凋亡情况一致性良好。

综上所述,Dex 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻由 LPS 介导的肺组织细胞凋亡及线粒体凋亡信号激活,继而改善 ALI,发挥肺保护作用。

#### 参考文献

- [1] Rubenfuld G D, Herridge M S. Epidemiology and outcomes of acute lung injury [J]. *Chest*, 2007, 131(2): 554-562.
- [2] Liu C J, Yang J X, Fu W J, et al. Coactivation of the PI3K/Akt and ERK signaling pathways in PCB153-induced NF- $\kappa$ B activation and caspase inhibition [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 277(3): 270-278.
- [3] Markou T, Chambers D J. Lung injury after simulated cardiopulmonary bypass in an isolated perfused rat lung preparation: Role of mitogen-activated protein kinase/Akt signaling and the effects of theophylline [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 148(5): 2335-2344.
- [4] Chang J S, Lin H J, Deng J S, et al. Preventive effects of velvet antler (*Cervus elaphus*) against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting MAPK/NF- $\kappa$ B activation and inducing AMPK/Nrf2 pathways [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 2870503.
- [5] Lee J, Kosaras B, del Signore S J, et al. Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function improves neuropathology in Huntington's disease mice [J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 121(4): 487-498.
- [6] Liang D H, Choi D S, Ensor J E, et al. The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair [J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(2): 249-258.
- [7] Xu Y Z, Zhang R Y, Li C L, et al. Dexmedetomidine attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mouse through inhibition of MAPK pathway [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2015, 29(5): 462-471.

- [8] Gao S Q, Wang Y L, Zhao J, *et al.* Effects of dexmedetomidine pretreatment on heme oxygenase-1 expression and oxidative stress during one-lung ventilation[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 3144-3149.
- [9] Cui J, Zhao H L, Wang C Y, *et al.* Dexmedetomidine attenuates oxidative stress induced lung alveolar epithelial cell apoptosis *in vitro* [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 358396.
- [10] Jiang Y X, Dai Z L, Zhang X P, *et al.* Dexmedetomidine alleviates pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol: Med Sci*, 2015, 35(5): 684-688.
- [11] Zhang Q Y, Wu D, Yang Y, *et al.* Effects of dexmedetomidine on the protection of hyperoxia-induced lung injury in newborn rats [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6466-6473.
- [12] Wu X J, Song X M, Li N T, *et al.* Protective effects of dexmedetomidine on blunt chest trauma-induced pulmonary contusion in rats [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013, 74(2): 524-530.
- [13] Martini M, de Santis M C, Braccini L, *et al.* PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review [J]. *Ann Med*, 2014, 46(6): 372-383.
- [14] Martelli A M, Tabellini G, Bressanin D, *et al.* The emerging multiple roles of nuclear Akt [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(12): 2168-2178.
- [15] Tsuchiya A, Kanno T, Nishizaki T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway [J]. *J Endocrinol*, 2014, 220(1): 49-59.
- [16] Risso G, Blaustein M, Pozzi B, *et al.* Akt/PKB: One kinase, many modifications [J]. *Biochem J*, 2015, 468(2): 203-214.
- [17] Lai J P, Bao S Y, Davis I C, *et al.* Inhibition of the phosphatase PTEN protects mice against oleic acid-induced acute lung injury [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(1): 189-200.
- [18] Zhao S P, Wu J, Zhang L M, *et al.* Post-conditioning with sevoflurane induces heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt pathway in lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2435-2440.
- [19] Zhang W, Zhang J Q, Meng F M, *et al.* Dexmedetomidine protects against lung ischemia-reperfusion injury by the PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. *J Anesth*, 2016, 30(5): 826-833.
- [20] Sureshbabu A, Syed M, Das P, *et al.* Inhibition of regulatory-associated protein of mechanistic target of rapamycin prevents hyperoxia-induced lung injury by enhancing autophagy and reducing apoptosis in neonatal mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(5): 722-735.
- [21] Aouacheria A, Baghdiguian S, Lamb H M, *et al.* Connecting mitochondrial dynamics and life-or-death events via Bcl-2 family proteins [J]. *Neurochem Int*, 2017, 109: 141-161.
- [22] Li J L, Wu H H, Xue G, *et al.* 17 $\beta$ -oestradiol protects primary-cultured rat cortical neurons from ketamine-induced apoptosis by activating PI3K/Akt/bcl-2 signalling [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 113(6): 411-418.
- [23] Meng Y, Wang W W, Kang J S, *et al.* Role of the PI3K/AKT signalling pathway in apoptotic cell death in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2417-2422.
- [24] Liu J, Jiang X W, Zhang Q, *et al.* Neuroprotective effects of Kukoamine A against cerebral ischemia via antioxidant and inactivation of apoptosis pathway [J]. *Neurochem Int*, 2017, 107: 191-197.
- [25] Lindblom R, Higgins G, Coughlan M, *et al.* Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy [J]. *Rev Diabet Stud*, 2015, 12(1/2): 134-156.
- [26] Wu Y Y, Xue B, Li X J, *et al.* Puerarin prevents high glucose-induced apoptosis of Schwann cells by inhibiting oxidative stress [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(33): 2583-2591.