

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.12.1337

· 论 著 ·

## 瑞芬太尼通过激活 PI3K/Akt/eNOS 通路减轻肾缺血/再灌注损伤

孔二亮<sup>1</sup>, 陈 默<sup>2</sup>, 拜云虎<sup>3</sup>, 邵金鹏<sup>4</sup>, 凤旭东<sup>1\*</sup>

1. 中国人民解放军联勤保障部队 988 医院麻醉科, 郑州 450042
2. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438
3. 中国人民解放军联勤保障部队 988 医院肝胆外科, 郑州 450042
4. 中国人民解放军联勤保障部队 988 医院泌尿外科, 郑州 450042

**[摘要]** **目的** 探讨术中应用瑞芬太尼对肾缺血/再灌注损伤的作用及机制。**方法** 取雄性 C57/BL 小鼠 50 只, 随机分为 5 组: 假手术组、缺血/再灌注损伤组(I/R 组)、缺血/再灌注损伤+磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抑制剂 LY294002 处理组(I/R+LY294002 组)、缺血/再灌注损伤+瑞芬太尼处理组(I/R+RF 组)、缺血/再灌注损伤+LY294002 处理+瑞芬太尼处理组(I/R+RF+LY294002 组), 每组 10 只。各组大鼠分别于手术结束 6 h 后取静脉血或肾脏组织, 采用全自动生化分析仪测定静脉血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)水平, 采用蛋白质印迹法检测肾脏组织 PI3K/蛋白激酶 B(Akt)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)通路相关蛋白的表达, H-E 染色观察肾脏组织炎症细胞聚集情况, 酶联免疫吸附试验测定肾脏组织中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 等炎症因子的表达, 实时定量 PCR 测定肾脏组织中抗凋亡因子 *Bcl2* 和凋亡因子半胱氨酸蛋白酶 3(*Caspase-3*)的 mRNA 表达。**结果** 与假手术组相比, I/R 组小鼠静脉血 BUN、SCr 水平均升高, 肾脏组织中 PI3K 表达及磷酸化 Akt(p-Akt)/Akt、磷酸化 eNOS(p-eNOS)/eNOS 均降低, 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 释放均增加, *Bcl2* mRNA 表达下降而 *Caspase-3* mRNA 表达增高, 差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ), 并且肾脏组织中炎症细胞聚集增多。给予瑞芬太尼处理后, I/R+RF 组 BUN、SCr 水平较 I/R 组降低, 肾脏组织中 PI3K 表达及 p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS 均增高, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 释放均减少, *Bcl2* mRNA 表达上调, *Caspase-3* mRNA 表达下调, 与 I/R 组相比差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ), 炎症细胞募集也减轻。而使用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理后, I/R+RF+LY294002 组 BUN、SCr 水平升高, 肾脏组织中 p-eNOS/eNOS 降低, IL-1 $\beta$ 、L-6 释放增加, *Caspase-3* mRNA 表达上调, 与 I/R+RF 组相比差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ), 炎症细胞募集也增加。**结论** 肾缺血/再灌注损伤时, 瑞芬太尼通过激活 PI3K/Akt/eNOS 通路减轻肾脏组织炎症反应和细胞凋亡发挥肾脏保护作用。

**[关键词]** 瑞芬太尼; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B; 内皮型一氧化氮合酶; 肾缺血/再灌注损伤; 炎症反应; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R 669.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)12-1337-07

### Remifentanyl alleviates renal ischemia/reperfusion injury by activating PI3K/Akt/eNOS pathway

KONG Er-liang<sup>1</sup>, CHEN Mo<sup>2</sup>, BAI Yun-hu<sup>3</sup>, SHAO Jin-peng<sup>4</sup>, FENG Xu-dong<sup>1\*</sup>

1. Department of Anesthesiology, No. 988 Hospital of Logistic Support Forces of PLA, Zhengzhou 450042, Henan, China
2. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China
3. Department of Hepatobiliary Surgery, No. 988 Hospital of Logistic Support Forces of PLA, Zhengzhou 450042, Henan, China
4. Department of Urology, No. 988 Hospital of Logistic Support Forces of PLA, Zhengzhou 450042, Henan, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect and mechanism of intraoperative remifentanyl (RF) on renal ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Fifty male C57/BL mice were randomly divided into 5 groups: sham group, I/R group, I/R+LY294002 (a phosphatidylinositol 3-kinase [PI3K] inhibitor) group, I/R+RF group and I/R+RF+LY294002 group, with 10 mice in each group. Venous blood or renal tissue samples were collected from the mice of each group 6 h after I/R operation. The levels of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were detected using automatic biochemical analyzer. The expression levels of PI3K/protein kinase B (Akt)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway-related proteins in renal tissues of mice were detected using Western blotting. The aggregation of inflammatory cells was observed by

**[收稿日期]** 2019-07-01 **[接受日期]** 2019-09-18

**[作者简介]** 孔二亮, 硕士, 主治医师. E-mail: kel1992@126.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 0371-60653400, E-mail: xdfeng153@163.com

H-E staining. The expression levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 in renal tissues of mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA expression levels of anti-apoptotic factor *Bcl2* and apoptotic factor *Caspase-3* in renal tissues were determined by real-time quantitative PCR. **Results** Compared with the sham group, the BUN and SCr levels in venous blood were increased in the I/R group, the PI3K expression, phosphorylated-Akt (p-Akt)/Akt ratio and phosphorylated-eNOS (p-eNOS)/eNOS ratio in renal tissues were decreased, the release levels of inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10) were increased, *Bcl2* mRNA expression was decreased, and *Caspase-3* mRNA expression was increased; and the differences were significant (all  $P < 0.05$ ). The mice of the I/R group had increased inflammatory cell recruitment in renal tissues. After RF treatment, the mice of the I/R + RF group had decreased levels of BUN and SCr in venous blood, increased PI3K expression, p-Akt/Akt ratio and p-eNOS/eNOS ratio in renal tissues, decreased release levels of inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10), increased *Bcl2* mRNA expression, and decreased *Caspase-3* mRNA expression; and the differences were significant compared with the mice of the I/R group (all  $P < 0.05$ ). The inflammatory cell recruitment was decreased in the I/R + RF group. Moreover, compared with the mice of the I/R + RF group, the mice of the I/R + RF + LY294002 group had increased levels of BUN and SCr in venous blood, decreased p-eNOS/eNOS ratio in renal tissues, increased IL-1 $\beta$  and IL-6 release, and increased *Caspase-3* mRNA expression; and the differences were significant (all  $P < 0.05$ ). The inflammatory cell recruitment was increased in the I/R + RF + LY294002 group. **Conclusion** RF exerts protective effect on kidney with I/R injury by alleviating renal inflammation and cell apoptosis through activating PI3K/Akt/eNOS pathway.

**[Key words]** remifentanyl; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; endothelial nitric oxide synthase; renal ischemia/reperfusion injury; inflammation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(12): 1337-1343]

肾缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion) 损伤是多种原因导致的肾急性缺血后血流再灌注引起的肾小管细胞非正常死亡, 常见于腹部外伤、失血性休克、严重感染、肾移植等, 是急性肾功能衰竭的常见诱因<sup>[1]</sup>。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) / 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 信号通路广泛参与了细胞能量代谢、氧化应激、细胞增殖等过程, 在肝、脑、肺缺血/再灌注损伤中发挥重要作用, 是介导缺血/再灌注损伤重要的细胞内途径之一<sup>[2]</sup>。同时 PI3K 能够促进磷酸化 Akt (p-Akt)、磷酸化 eNOS (p-eNOS) 表达, 因此 p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS 比值可反映 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的活化程度<sup>[3]</sup>。瑞芬太尼 (remifentanyl) 作为一种短效阿片类药物, 能够通过抑制炎症反应、脂质过氧化及细胞凋亡等对心、肝、肾缺血/再灌注损伤发挥保护作用<sup>[4]</sup>。本研究考察了瑞芬太尼能否通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路对肾脏组织的炎症反应及细胞凋亡产生影响, 从而减轻肾缺血/再灌注损伤。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物、分组及试剂 健康雄性 C57/BL

小鼠 (体质量 20~30 g) 50 只, 购自海军军医大学 (第二军医大学) 实验动物中心 [动物生产许可证号: SCXK (沪) 2018-0006]。小鼠在 12 h/12 h 光照条件空调室内饲养, 室温 22~25 °C, 湿度 40%~60%, 自由饮水和食物。将小鼠随机分为 5 组: 假手术组、缺血/再灌注损伤组 (I/R 组)、缺血/再灌注损伤 + PI3K 抑制剂 LY294002 处理组 (I/R + LY294002 组)、缺血/再灌注损伤 + 瑞芬太尼处理组 (I/R + RF 组)、缺血/再灌注损伤 + LY294002 处理 + 瑞芬太尼处理组 (I/R + RF + LY294002 组), 每组 10 只。

盐酸瑞芬太尼溶液 (美国 Sigma 公司) 用生理盐水稀释后, 术中以 1  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  尾静脉泵注 30 min; LY294002 (美国 Sigma 公司) 溶于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 后, 术前 1 h 以 0.2 mg/kg 腹腔注射。实验中所用一抗包括兔抗 PI3K 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 稀释比例 1:1 000)、兔抗 p-Akt 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 1:5 000)、兔抗 Akt 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 1:1 000)、兔抗 p-eNOS 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 1:5 000)、小鼠抗 eNOS 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 1:1 000)、小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase, GAPDH; 美国 CST 公司, 1 : 5 000), 二抗包括抗兔二抗 (美国 CST 公司, 稀释比例 1 : 5 000)、抗小鼠二抗 (美国 CST 公司, 1 : 5 000)。小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒均购自英国 Abcam 公司。

1.2 肾缺血/再灌注损伤模型的建立 腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉小鼠后, 手术暴露双侧肾脏, 分离两侧肾动脉、肾静脉, 用无创动脉夹阻断双侧肾动脉 60 min 并观察肾脏颜色变化, 随后松开动脉夹恢复血流。假手术组小鼠仅暴露双侧肾脏、分离肾动脉和肾静脉, 不夹闭肾动脉。分层缝合切口, 肌内注射青霉素预防切口感染。各组分别于手术结束 6 h 后取静脉血或肾脏组织进行相关检测。

1.3 肾功能测定 各组小鼠取静脉血, 使用 Cobas Integra 800 全自动生化分析仪 (瑞士 Roche 公司) 检测血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐 (serum creatinine, SCr) 水平。

1.4 蛋白质印迹法检测 各组小鼠处死后取适量肾脏组织, 加入 RIPA 裂解液超声匀浆后放入旋转摇床 4  $^{\circ}\text{C}$  下裂解 1 h, 于低温 3 000 $\times$ g 离心 20 min, 取上清。采用 BCA 法测定蛋白质浓度, 取 30  $\mu\text{g}$  蛋白样品高温变性, 上样后 60 V 30 min、90 V 120 min 电泳, 300 mA 100 min 转膜。室温封闭 2 h, 加一抗, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日洗膜后, 加入二抗室温孵育 2 h, 洗膜后用 Image Quant LAS4000 数码成像仪 (美国 GE 公司) 观察、拍照。采用 Photoshop 软件测量蛋白质条带的灰度值, 目的蛋白的相对含量 = 目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

1.5 H-E 染色 取肾脏组织, 用二甲苯固定 30 min, 100%、95%、85%、75% 乙醇溶液分别脱水 5 min。蒸馏水冲洗后加入苏木精染液染色 10 min, 放入 1% 盐酸溶液 5 s 后用蒸馏水冲洗。滴加伊红染液复染 5 min, 然后用上述不同浓度的乙醇溶液分别继续脱水 2 min; 加入二甲苯进行透明处理, 滴加中性树脂进行封片, 在光学显微镜下观察。

1.6 炎症因子测定 取部分肾脏组织, 用玻璃匀浆器匀浆, 4  $^{\circ}\text{C}$  3 000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清液。分别按照 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒说明书配制相应标准品, 分别将样本和各标准品加入

相应孔中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。标准品设 2 个复孔, 样本设 3 个复孔, 用封板胶纸严密封住反应孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 90 min 后加入 350  $\mu\text{L}$  洗涤液, 洗板 3 次。每孔中加入生物素化抗体工作液 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min, 洗板。每孔中加入酶结合物工作液 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 洗板。加入显色剂 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 20 min, 加入终止液 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 混匀后即刻使用酶标仪测定 450 nm 波长处光密度值, 根据各标准品得出的浓度曲线计算样本相应炎症因子浓度, 取 3 个复孔平均值为最终浓度。

1.7 实时定量 PCR 检测 取肾脏组织加入 1 mL TRIzol 试剂充分匀浆, 转移至 1.5 mL 无 RNA 酶 EP 管中, 室温静置 10 min 后加入 0.2 mL 氯仿, 4  $^{\circ}\text{C}$  3 000 $\times$ g 离心 15 min, 取上清液; 加入等体积异丙醇, 混匀后 3 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清; 加入 1 mL 75% 乙醇溶液洗涤, 3 000 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清; 加入无 RNA 酶水充分溶解; 用分光光度计测量 RNA 浓度和纯度。反转录获得 cDNA, 反应条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min、85  $^{\circ}\text{C}$  15 s、4  $^{\circ}\text{C}$  10 min 循环 1 次。以 cDNA 为模板, 使用 PCR 仪进行扩增, 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s、60  $^{\circ}\text{C}$  15 s、72  $^{\circ}\text{C}$  40 s 循环 40 次。引物序列: *Bcl2* 正义引物 5'-GAT TGT GGC CTT CTT TGA GTT-3', 反义引物 5'-AGT TCC ACA AAG GCA TCC CA-3'; 半胱氨酸蛋白酶 (*Caspase*) -3 正义引物 5'-AGT TGG ACC CAC CTT GTG AG-3', 反义引物 5'-AGT CTG CAG CTC CTC CAC AT-3'; *GAPDH* 正义引物 5'-CCA CTC CTC CAC CTT TGA CG-3', 反义引物 5'-TAG CCA AAT TCG TTG TCA TAC CAG G-3'。计算每个样本的  $\Delta\text{Ct}$  值, 并比较相对表达量。

1.8 统计学处理 使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 然后进行 Tukey 检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 肾功能改变 I/R 组小鼠静脉血 BUN、SCr 水平升高, 与假手术组相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 说明缺血/再灌注可导致小鼠肾功能损伤。I/R + RF 组小鼠静脉血 BUN、SCr 水平均较 I/R 组降低, 差异均有统计学意义

( $P$ 均 $<0.05$ ), 而I/R+RF+LY294002组BUN、SCr与I/R+RF组相比有所回升, 差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ), 提示术中应用瑞芬太尼在小

鼠肾缺血/再灌注损伤中具有肾脏保护作用, 而抑制PI3K能够减弱瑞芬太尼的保护作用。见图1。

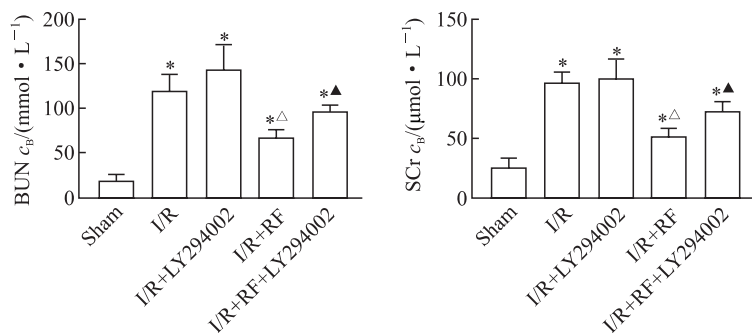


图1 各组小鼠肾功能

Fig 1 Renal function of mice in each group

LY294002 is a PI3K inhibitor. I/R: Ischemia/reperfusion; RF: Remifentanyl; BUN: Blood urea nitrogen; SCr: Serum creatinine; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase. \* $P$  $<0.05$  vs sham group;  $\Delta$  $P$  $<0.05$  vs I/R group;  $\blacktriangle$  $P$  $<0.05$  vs I/R+RF group.  $n=10$ ,  $\bar{x}\pm s$

2.2 瑞芬太尼对PI3K/Akt/eNOS通路相关蛋白表达的影响 I/R组、I/R+LY294002组小鼠肾脏组织中PI3K的表达及p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS均较假手术组降低( $P$ 均 $<0.05$ ), 提示缺血/再灌注损伤可降低肾脏组织中PI3K、Akt、eNOS蛋白的表达。而I/R+RF组小鼠肾脏组织中PI3K的表

达及p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS均较I/R组升高( $P$  $<0.05$ ); 经PI3K抑制剂LY294002处理后, I/R+RF+LY294002组小鼠p-eNOS/eNOS下降, 与I/R+RF组相比差异有统计学意义( $P$  $<0.05$ )。提示瑞芬太尼能够增加PI3K、Akt、eNOS蛋白的表达。见图2。

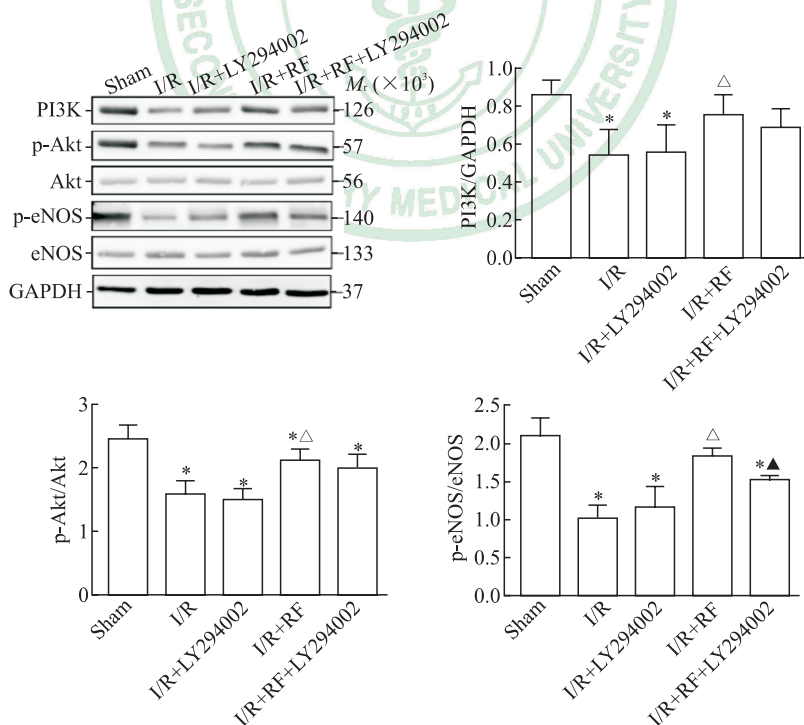


图2 蛋白质印迹法分析小鼠肾脏组织中PI3K/Akt/eNOS通路相关蛋白的表达

Fig 2 PI3K/Akt/eNOS pathway-related protein expression in renal tissues of mice detected by Western blotting

LY294002 is a PI3K inhibitor. PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; p-Akt: Phosphorylated-protein kinase B; Akt: Protein kinase B; p-eNOS: Phosphorylated-endothelial nitric oxide synthase; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; I/R: Ischemia/reperfusion; RF: Remifentanyl. \* $P$  $<0.05$  vs sham group;  $\Delta$  $P$  $<0.05$  vs I/R group;  $\blacktriangle$  $P$  $<0.05$  vs I/R+RF group.  $n=10$ ,  $\bar{x}\pm s$

2.3 瑞芬太尼通过 PI3K/Akt/eNOS 通路减轻肾炎症细胞及炎性因子的释放 如图 3 所示, 缺血/再灌注损伤小鼠肾脏组织炎症细胞募集多于假手术组, 而应用瑞芬太尼后炎症细胞浸润减轻。如图 4 所示, I/R 组、I/R + LY294002 组小鼠肾脏组织炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 释放均多于假手术组 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 应用瑞芬太尼后 I/R + RF 组小鼠肾

脏组织中上述炎性因子的释放均减少, 与 I/R 组相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 而 LY294002 处理后即 I/R + RF + LY294002 组瑞芬太尼减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6 释放的效应减弱, 与 I/R + RF 组相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 提示瑞芬太尼通过增强 PI3K/Akt/eNOS 通路减轻肾缺血/再灌注损伤后的炎症反应。

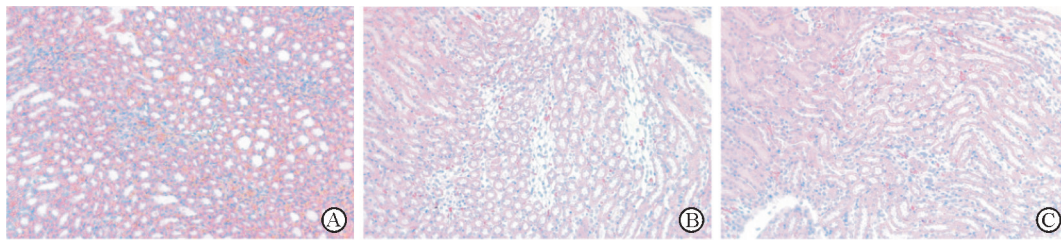


图 3 小鼠肾脏组织的 H-E 染色

Fig 3 H-E staining of renal tissues of mice

A: Sham group; B: I/R group; C: I/R + RF group. I/R: Ischemia/reperfusion; RF: Remifentanil. Original magnification:  $\times 400$

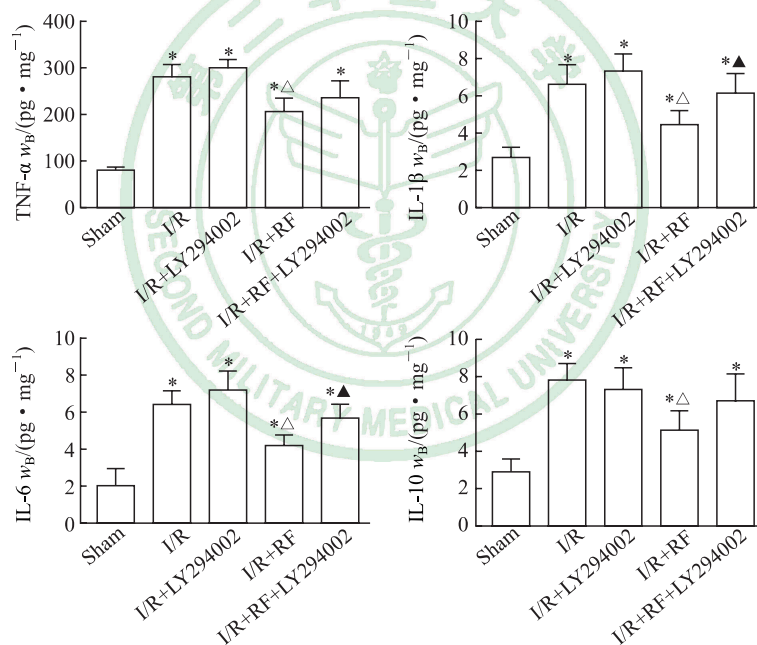


图 4 酶联免疫吸附试验检测小鼠肾脏组织中炎性因子的表达

Fig 4 Inflammatory factor expression in renal tissues of mice detected by enzyme-linked immunosorbent assay

LY294002 is a PI3K inhibitor. I/R: Ischemia/reperfusion; RF: Remifentanil; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IL: Interleukin. \* $P < 0.05$  vs sham group;  $\Delta P < 0.05$  vs I/R group;  $\Delta P < 0.05$  vs I/R + RF group.  $n = 10, \bar{x} \pm s$

2.4 瑞芬太尼通过 PI3K/Akt/eNOS 通路减轻肾脏细胞凋亡 实时定量 PCR 结果显示, I/R 组、I/R + LY294002 组小鼠肾脏组织中抗凋亡因子 *Bcl2* mRNA 的表达降低, 而凋亡因子 *Caspase-3* mRNA 表达增加, 与假手术组相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。瑞芬太尼处理后, I/R + RF 组小鼠肾脏组织中 *Bcl2* mRNA 表达较 I/R 组升高, *Caspase-3* mRNA 表达降低, 差异均有统计学意义

( $P$  均  $< 0.05$ )。给予 PI3K 抑制剂 LY294002 处理后, I/R + RF + LY294002 组小鼠肾脏组织中 *Bcl2* mRNA 的表达有所降低, 但与 I/R + RF 组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 *Caspase-3* mRNA 表达升高且与 I/R + RF 组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示瑞芬太尼通过增强 PI3K/Akt/eNOS 通路减轻肾脏缺血/再灌注损伤后的细胞凋亡。见图 5。

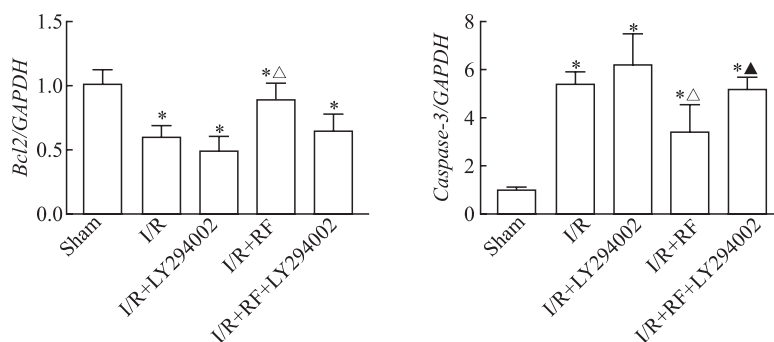


图5 实时定量PCR分析小鼠肾脏组织中抗凋亡因子 *Bcl2* 和凋亡因子 *Caspase-3* 的 mRNA 表达

Fig 5 mRNA expression of anti-apoptotic factor *Bcl2* and apoptotic factor *Caspase-3* in renal tissues of mice detected by real-time quantitative PCR

LY294002 is a PI3K inhibitor. I/R: Ischemia/reperfusion; RF: Remifentanyl; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase. \* $P < 0.05$  vs sham group;  $\Delta P < 0.05$  vs I/R group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs I/R + RF group.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

随着肾移植、肾部分切除等手术日益增多,肾缺血/再灌注损伤在临床诊疗过程中难以避免。血流再灌注是导致肾损伤的主要因素,可引起急性肾小管坏死,甚至诱发肾功能衰竭,影响术后肾功能恢复,严重时可危及患者生命<sup>[5]</sup>。PI3K/Akt/eNOS 通路属于酪蛋白激酶受体型信号转导通路,通过影响细胞内多种第二信使参与细胞增殖、血管新生等活动,并参与缺血/再灌注损伤过程中的多个重要环节<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,瑞芬太尼通过增强 Akt、eNOS 磷酸化,减少肾脏组织中炎症细胞的募集和炎性因子的释放,以及上调抗凋亡因子 *Bcl2*、减少凋亡因子 *Caspase-3* 的表达保护肾脏功能;然而,该作用可被 PI3K 抑制剂 LY294002 减弱。上述结果证明瑞芬太尼通过激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路减轻肾脏炎症反应和细胞凋亡而发挥肾脏保护作用。

eNOS 广泛存在于内皮细胞中,是调控内皮源性一氧化氮产生的关键酶,而一氧化氮在促进细胞增殖、黏附、迁移和血管新生过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。PI3K/Akt/eNOS 通路能够通过调节凋亡相关蛋白的表达,调节细胞凋亡进程<sup>[8]</sup>。Akt 激活后能够介导下游多条信号通路的激活,从而抑制线粒体通透性转运孔的开放,维持细胞膜的稳定性,减缓细胞凋亡。eNOS 激活有助于改善血管功能和内皮细胞功能,促进血管新生。而 LY294002 作为 PI3K 抑制剂,通过抑制 Akt 苏氨酸和丝氨酸位点磷酸化,阻断 PI3K/Akt 通路的激活,从而导致 eNOS 活性

降低,使其介导的细胞增殖、凋亡、炎症反应及免疫反应等功能受到影响<sup>[9]</sup>。

细胞凋亡是缺血/再灌注损伤过程中肾损伤的一个重要机制,炎性介质或氧自由基等通过激活 *Caspase-8* 或 *Caspase-9* 促进肾小管上皮细胞凋亡,两者又可激活 *Caspase-3* 引起 DNA 链断裂和基因突变,从而促进细胞凋亡。此外,促凋亡基因 *Bcl2* 关联 X 蛋白、*Bcl2* 相关死亡促进因子、*Bcl2* 同源拮抗蛋白等表达增加及抗凋亡基因 *Bcl2*、*Bcl-x* 等表达减少也可促进细胞凋亡<sup>[10]</sup>。在缺血状态下,肾小管上皮细胞内 ATP 过度消耗使线粒体  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  离子通道受到抑制,线粒体内膜通透性增加,导致  $\text{Ca}^{2+}$  内流增加及线粒体肿胀;同时缺氧能够损伤电子传递链中复合物的功能,易发生电子泄露和爆发性氧自由基堆积,影响细胞正常能量代谢,导致细胞释放凋亡因子、细胞色素 C 和凋亡诱导因子等,启动细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

肾脏组织中的炎症反应、过度免疫应答是肾缺血/再灌注损伤的又一重要机制。再灌注过程中大量炎性因子释放入血、血管内皮细胞和白细胞表面黏附分子表达升高、白细胞过度激活等加剧了肾小管上皮细胞损伤。在炎症反应的过程中,巨噬细胞既发挥效应细胞的功能,又发挥抗原呈递细胞的作用。巨噬细胞活化后,吞噬病原体并释放多种重要炎性因子,如 IL-1、IL-6、IL-10、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等<sup>[12]</sup>。正常情况下肾组织内巨噬细胞数量较少,但缺血后大量巨噬细胞随血流灌注进入肾组织并分泌细胞因子激活白细胞,诱发级联炎症反应<sup>[13]</sup>。

本研究结果显示,瑞芬太尼能通过 PI3K/Akt/

eNOS 通路上调抗凋亡因子 *Bcl2* mRNA 的表达, 减少凋亡因子 *Caspase-3* mRNA 的表达, 保护细胞内 DNA、线粒体的完整性, 共同减缓细胞凋亡的进展; 同时也可减轻肾脏组织内炎症细胞的募集, 减少炎症因子释放, 从而减轻肾脏炎症反应, 从多个方面发挥肾脏保护作用。

综上所述, 肾缺血/再灌注时肾脏组织发生炎症反应, 细胞凋亡增加, 使肾功能受损。瑞芬太尼能通过激活肾脏细胞中 PI3K/Akt/eNOS 通路减少炎症细胞的募集和炎症因子的释放, 并增加抗凋亡因子、减少凋亡因子的表达, 从而减缓细胞凋亡, 发挥肾脏保护作用。本研究结果为肾脏手术患者围手术期合理使用镇痛药物瑞芬太尼提供了理论依据, 同时为保护肾缺血/再灌注损伤患者围手术期肾功能提供了新的治疗靶点和思路。

#### [参考文献]

- [1] CAI Y, XU H, YAN J, ZHANG L, LU Y. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 1542-1550.
- [2] WANG P, HE Y, LI D, HAN R, LIU G, KONG D, et al. Class I PI3K inhibitor ZSTK474 mediates a shift in microglial/macrophage phenotype and inhibits inflammatory response in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury[J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13: 192. doi: 10.1186/s12974-016-0660-1.
- [3] PEKTAS M B, TURAN O, OZTURK BINGOL G, SUMLU E, SADI G, AKAR F. High glucose causes vascular dysfunction through Akt/eNOS pathway: reciprocal modulation by juglone and resveratrol[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96: 757-764.
- [4] YANG L Q, TAO K M, LIU Y T, CHEUNG C W, IRWIN M G, WONG G T, et al. Remifentanyl preconditioning reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via inducible nitric oxide synthase expression[J]. *Anesthesiology*, 2011, 114: 1036-1047.
- [5] NISHIKAWA H, TANIGUCHI Y, MATSUMOTO T, ARIMA N, MASAKI M, SHIMAMURA Y, et al. Knockout of the interleukin-36 receptor protects against renal ischemia-reperfusion injury by reduction of proinflammatory cytokines[J]. *Kidney Int*, 2018, 93: 599-614.
- [6] ARAB H H, SALAMA S A, MAGHRABI I A. Camel milk attenuates methotrexate-induced kidney injury via activation of PI3K/Akt/eNOS signaling and intervention with oxidative aberrations[J]. *Food Funct*, 2018, 9: 2661-2672.
- [7] VIMALRAJ S, BHUVANESWARI S, LAKSHMIKIRUPA S, JYOTHSNA G, CHATTERJEE S. Nitric oxide signaling regulates tumor-induced intussusceptive-like angiogenesis[J]. *Microvasc Res*, 2018, 119: 47-59.
- [8] GE L, LI C, WANG Z, ZHANG Y, CHEN L. Suppression of oxidative stress and apoptosis in electrically stimulated neonatal rat cardiomyocytes by resveratrol and underlying mechanisms[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 70: 396-404.
- [9] WEI Y, ZHOU J, YU H, JIN X. AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83: 429-435.
- [10] HAO J, WEI Q, MEI S, LI L, SU Y, MEI C, et al. Induction of microRNA-17-5p by p53 protects against renal ischemia-reperfusion injury by targeting death receptor 6[J]. *Kidney Int*, 2017, 91: 106-118.
- [11] LI J, CHEN Q, HE X, ALAM A, NING J, YI B, et al. Dexmedetomidine attenuates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury through  $\alpha_2$ AR/PI3K/Akt pathway[J/OL]. *J Transl Med*, 2018, 16: 78. doi: 10.1186/s12967-018-1455-1.
- [12] ABOUTALEB N, JAMALI H, ABOLHASANI M, PAZOKI TOROUDI H. Lavender oil (*Lavandula angustifolia*) attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 9-19.
- [13] TIAN H, WU M, ZHOU P, HUANG C, YE C, WANG L. The long non-coding RNA MALAT1 is increased in renal ischemia-reperfusion injury and inhibits hypoxia-induced inflammation[J]. *Ren Fail*, 2018, 40: 527-533.

[本文编辑] 杨亚红