

基于 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 信号通路研究右美托咪定对大鼠 ALI 的保护作用

夏雪宜, 蒋乐凤, 欧阳婉*

邵阳学院附属第二医院, 湖南 邵阳 422000

DOI:10.61369/MRP.2025110026

摘 要 : 目的: 探究基于 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 信号通路研究右美托咪定对大鼠 ALI 的保护作用。方法: 选取 70 只雄性 SD 大鼠, 经随机分配分成 3 组, 对照组 (共 30 只) 接受生理盐水注射, 模型组 (共 10 只) 建立 LPS 所致的大鼠急性肺损伤模型, 观察组 (共 30 只) 则接受 5 μ g/kg 剂量的右美托咪定进行腹腔注射。待造模成功后 24 h 检测对照组与观察组大鼠不同时间肺组织 (W/D) 比值、肺损伤评分、MPO 活力, 支气管肺泡灌洗液 (BALF) IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 含量; RT-PCR 检测各 mRNA 表达差异, 免疫组化和 Western blot 检测 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 表达。结果: 相比对照组, 观察组在各时间点的 W/D 比值、肺损伤评分和 MPO 活力上升 ($P < 0.05$); 相比对照组, 观察组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平上升 ($P < 0.05$); 相比对照组, 观察组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平上升 ($P < 0.05$); 相比对照组, 观察组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 GAPDH 蛋白表达水平上升 ($P < 0.05$); 相比对照组, 观察组 p-GSK-3 β / GSK-3 β 蛋白、p-STAT3 / STAT3 蛋白、p-NF- κ B / NF- κ B 蛋白表达水平上升 ($P < 0.05$)。结论: 右美托咪定可降低大鼠 ALI 模型肺组织 W/D 比值, 减轻肺水肿, 缓解炎症反应。此外, 右美托咪定还能抑制 GSK-3 β 、STAT3、NF- κ B 蛋白表达, 调控 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 信号通路, 从而发挥保护作用。

关 键 词 : GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 信号通路; 右美托咪定; 大鼠 ALI; 保护作用

Study on the Protective Effect of Dexmedetomidine on ALI in Rats based on GSK-3 β /STAT3-NF- κ B Signaling Pathway

Xia Xueyi, Jiang Lefeng, Ouyang Wan*

The Second Affiliated Hospital of Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000

Abstract : Objective: To investigate the protective effect of dexmedetomidine on acute lung injury (ALI) in rats via the GSK-3 β /STAT3-NF- κ B signaling pathway. Methods: Seventy male SD rats were randomly divided into three groups. The control group (n=30) received saline injection. The model group (n=10) developed LPS-induced acute lung injury. The observation group (n=30) received intraperitoneal injection of dexmedetomidine at 5 μ g/kg. Twenty-four hours after successful modeling, the following parameters were measured in the control and observation groups at different time points: lung tissue (W/D) ratio, lung injury score, MPO activity, and BALF IL-1 β , TNF- α , and IL-6 levels. RT-PCR was used to detect differences in mRNA expression, while immunohistochemistry and Western blot were employed to examine GSK-3 β /STAT3-NF- κ B expression. Results: Compared with the control group, the observation group exhibited increased W/D ratios, lung injury scores, and MPO activity at all time points ($P < 0.05$). Compared with the control group, the observation group showed elevated levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α ($P < 0.05$). Compared with the control group, the observation group demonstrated increased mRNA expression levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α ($P < 0.05$). Compared with the control group, the observation group showed increased protein expression levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and GAPDH ($P < 0.05$). Compared with the control group, the observation group exhibited increased protein expression levels of p-GSK-3 β / GSK-3 β , p-STAT3/STAT3, and p-NF- κ B/NF- κ B ($P < 0.05$). Conclusion: Dexmedetomidine reduces the lung water/dry weight ratio in a rat ALI model, alleviates pulmonary edema, and mitigates inflammatory responses. Furthermore, it inhibits GSK-3 β , STAT3, and NF- κ B protein expression, modulating the GSK-3 β /STAT3-NF- κ B signaling pathway to exert protective effects.

Keywords : GSK-3 β -STAT3-NF- κ B signaling pathway; dexmedetomidine; rat ALI; protective effect

基金项目: 邵阳市科技创新指导项目, 项目名称: 基于 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 信号通路研究右美托咪定对大鼠 ALI 的保护作用, 项目编号: 2022GX4112。

作者简介: 夏雪宜 (1976-), 男, 汉族, 湖南邵阳人, 本科研究方向: 麻醉科。

引言

急性肺损伤 (ALI) 作为一种普遍且病情危重的呼吸道疾病, 其核心病理变化在于肺泡毛细血管壁的损伤, 临床通常可见肺水肿、炎症反应和气体弥散功能障碍等症状, 其发病率较高, 据统计, 全球每年有大量患者因各种原因引发 ALI^[1,2]。ALI 临床治疗死亡率高, 重症患者死亡率超 40%, 治愈后易留后遗症, 治疗手段也有限, 包括机械通气、抗生素和皮质类固醇激素, 且预后不佳。GSK-3 β 是一种关键调节激酶, 在细胞内蛋白质平衡中起作用。但在急性肺损伤 (ALI) 时, 其活性可能异常被激活, 影响下游信号传递^[3]。STAT3 是一种重要的转录因子, 激活后可进入细胞核, 促进炎症基因表达, 引发肺部炎症反应加剧。核转录因子 NF- κ B 在急性肺损伤过程中扮演着至关重要的角色, 是此病理调控机制中的核心因素, 其激活可引发炎症因子增加、肺泡渗透性上升、肺部水肿, 对肺修复及损伤恢复造成影响^[4,5]。右美托咪定能有效遏制交感神经的兴奋性, 削减炎症介质的释放量, 降低炎症因子浓度, 从而缓解炎症的进程, 此外, 它还能调整免疫细胞的功能, 减少肺部组织的损伤程度^[6,7]。本研究探究右美托咪定对大鼠急性肺损伤 (ALI) 的保护效果, 通过建立 ALI 模型, 分析其对炎症及 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 信号通路的作用。

一、资料与方法

(一) 实验动物与分组

选 70 只健康的清洁级雄性 SD 大鼠, 体重介于 200 至 250 克, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。大鼠饲养于符合标准的动物实验室中, 保持室内温度在 23℃ 至 25℃ 之间, 相对湿度维持在 50% 至 60%, 实行 12 小时的昼夜交替制度。大鼠可以自由进食和饮水, 在适应环境 1 周之后开始进行实验。

(二) 分组与建模

选取 70 只雄性 SD 大鼠, 经随机分配分成 3 组, 对照组 (共 30 只) 接受生理盐水注射, 模型组 (共 10 只) 建立 LPS 所致的大鼠急性肺损伤模型, 观察组 (共 30 只) 则接受 5 μ g/kg 剂量的右美托咪定进行腹腔注射。各组大鼠在相同环境下饲养, 实验过程中密切观察大鼠的精神状态、呼吸频率等生理指标, 确保实验的顺利进行。

在构建大鼠 ALI 模型前, 先测体重。接着对大鼠进行 10% 水合氯醛 (剂量为 3ml/kg) 的腹腔注射麻醉, 待大鼠固定后, 对颈部区域进行消毒处理。随后, 切开颈部皮肤并分离肌肉以暴露气管, 给予 5mg/kg 剂量的 LPS 注射。在环状软骨下第 2 至第 3 气管环之间进行穿刺, 并缓慢地将 LPS 溶液注入, 注射完毕后迅速拔出针头, 轻轻按摩大鼠颈部, 将 LPS 液体匀称地注入大鼠肺部, 随后对颈部创口进行缝合及消毒处理。待大鼠恢复意识后, 对其呼吸频率及唇部颜色进行监测。若观察到大鼠呼吸加快、口唇呈现青紫, 即可判定 ALI 模型构建成功。建模成功后, 密切观察大鼠状态, 为后续给药及检测做好准备。

(三) 观察指标

1. 两组肺组织 W/D 比值、肺损伤评分、MPO 活力比较

建模成功 24 小时后, 通过腹腔注射麻醉剂麻醉动物, 取出左肺上叶, 去除表面血液测湿重 (W), 然后将组织烘干至恒重得到干重 (D), 计算 W/D 比值以评估肺水肿程度。

采用病理学评估方法 (如 HE 染色切片观察), 根据肺泡结构破坏、炎症细胞浸润、出血水肿、透明膜形成等病理特征, 采用规范化评分机制 (如 0-4 分制, 分值越高代表损伤越严重)。

0 分: 肺部组织结构保持正常, 未出现损伤; 1 分: 部分肺泡壁增厚, 伴有轻微炎症浸润; 2 分: 部分肺泡结构受损, 出现中度炎症反应及水肿; 3 分: 肺泡结构遭到严重破坏, 炎症细胞大量浸润, 伴有显著出血和水肿; 4 分: 肺泡结构彻底损毁, 广泛出血和透明膜生成。通过荧光酶联反应测定法来评估肺组织内 MPO 的活性。

2. 两组 BALF 中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达水平及 GAPDH 蛋白表达水平比较

采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 技术测定 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 浓度, 严格按照试剂盒指南操作。

运用实时荧光定量 RT-PCR 技术探究 mRNA 水平的差异表达, 涉及组织样本采集、RNA 的提取以及 cDNA 的合成过程。在本实验中, 选取 GAPDH 作为内参照, 通过实时荧光定量 PCR 技术对 GSK-3 β 、STAT3 和 NF- κ B 的相对表达量进行测定。

3. 两组 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 蛋白表达

进行 Western blot 实验时, 首先获取了大鼠右侧肺部的组织样本, 提取总蛋白质, 并利用 BCA 法对其进行了定量分析。通过 SDS-PAGE 分离蛋白后, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 夜间与一抗孵育, 第二天, 进行二抗的孵育, 并最终采用 ECL 技术对目标蛋白质进行检测, 同时以 β -actin 作为内部参照标准。免疫组化检测时, 取大鼠右肺中叶组织, 固定后制作石蜡切片, 按照免疫组化试剂盒说明书进行操作, 观察 GSK-3 β 、STAT3 和 NF- κ B 等蛋白的表达情况。

(四) 统计学处理

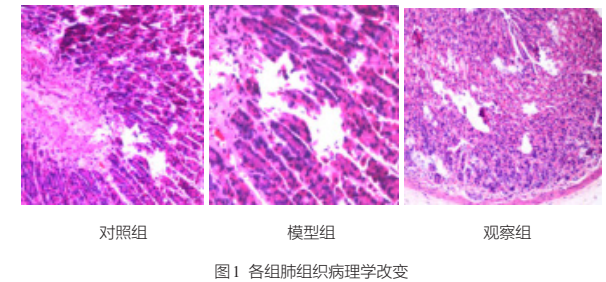
采用 SPSS24.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, 计数资料以百分比 (%) 表示, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

二、结果

(一) 各组肺组织病理学改变

光镜下观察显示, 对照组大鼠的肺组织保持正常结构, 未观察到炎症迹象; 模型组的大鼠肺组织遭受严重损害, 表现为肺泡的塌陷、壁层变厚且轮廓不清, 肺泡腔内充满红细胞和炎症渗出

物，间质中可见炎症细胞的浸润，显示ALI的典型病理变化；观察组大鼠的肺损伤程度有所减轻，炎症反应和渗出程度均有所下降。



(二) 两组肺组织 W/D 比值、肺损伤评分、MPO 活力比较

如表1所示，相比对照组，观察组在各时间点的 W/D 比值、肺损伤评分和 MPO 活力上升，有差异 ($P < 0.05$)。

表1 两组肺组织 W/D 比值、肺损伤评分、MPO 活力比较

指标	对照组 (n=30)	观察组 (n=30)				
		4h	6h	8h	12h	24h
W/D 比值	4.26 ± 0.48	4.46 ± 1.03	4.69 ± 1.26	4.82 ± 1.30	5.13 ± 0.86	4.52 ± 1.69
肺损伤评分	0.89 ± 0.16	4.29 ± 1.57	6.37 ± 1.73	6.69 ± 1.86	7.46 ± 1.75	7.80 ± 1.60
MPO 活力	3.45 ± 0.85	7.05 ± 0.86	8.23 ± 1.12	8.67 ± 1.53	9.60 ± 1.70	9.98 ± 1.85
t 值	36.480	4.959	4.299	4.514	6.545	7.720
P 值	0.001	0.006	0.006	0.003	0.001	0.001

(三) 两组 BALF 中炎症因子表达水平比较

如表2所示，相比对照组，观察组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平上升，有差异 ($P < 0.05$)。

表2 两组 BALF 中炎症因子表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng / mL)

组别	例数	IL-6	IL-1 β	TNF- α
对照组	30	60.57 \pm 5.57	7.67 \pm 0.89	89.43 \pm 6.45
观察组	30	233.46 \pm 10.12	30.67 \pm 1.78	257.34 \pm 16.56
t 值		84.980	63.30	51.750
P 值		0.001	0.001	0.001

(四) 两组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达水平比较

如表3所示，相比对照组，观察组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平上升，有差异 ($P < 0.05$)。

表3 两组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达水平比较

组别	例数	IL-6 mRNA	IL-1 β mRNA	TNF- α mRNA
对照组	30	1.02 \pm 0.15	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.10
观察组	30	2.02 \pm 0.25	2.78 \pm 0.30	3.14 \pm 0.40
t 值		42.343	35.677	28.905
P 值		0.001	0.001	0.001

(五) 两组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 GAPDH 蛋白表达水平比较

如表4、图2所示，观察组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 GAPDH 蛋白表达水平高于对照组，有差异 ($P < 0.05$)。

表4 两组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 GAPDH 蛋白表达水平比较

组别	例数	IL-6/GAPDH 蛋白	IL-1 β /GAPDH 蛋白	TNF- α /GAPDH 蛋白
对照组	30	0.48 ± 0.15	0.36 ± 0.07	0.43 ± 0.10
观察组	30	1.10 ± 0.29	1.09 ± 0.16	0.94 ± 0.21
t 值		10.400	22.890	12.010
P 值		0.001	0.001	0.001

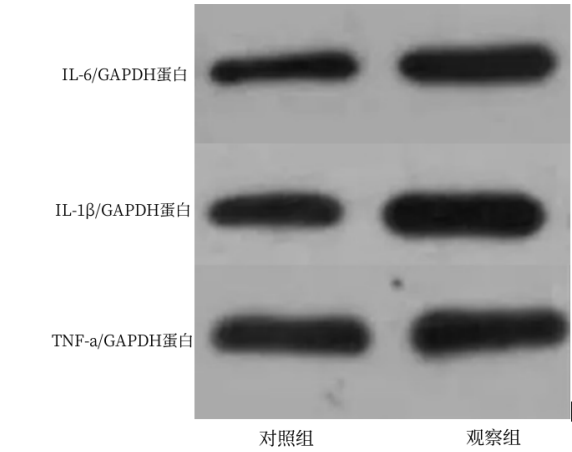


图2 两组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 GAPDH 蛋白表达水平

(六) 两组 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 蛋白表达

如表5、图3所示，观察组 p-GSK-31 β / GSK-3 β 蛋白、p-STAT3 / STAT3 蛋白、p-NF-KB / NF-KB 蛋白表达水平高于对照组，有差异 ($P < 0.05$)。

表5 两组 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 蛋白表达

组别	例数	p-GSK-31 β / GSK-3 β 蛋白	p-STAT3 / STAT3 蛋白	p-NF-KB / NF-KB 蛋白
对照组	30	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.15
观察组	30	2.78 \pm 0.18	4.67 \pm 0.28	4.12 \pm 0.22
t 值		25.671	30.125	35.893
P 值		0.001	0.001	0.001

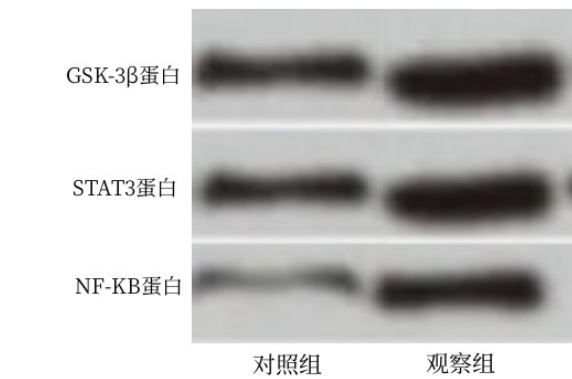


图3 两组 GSK-3 β /STAT3-NF- κ B 蛋白表达

三、讨论

内毒素 (LPS) 诱发的脓毒症属于全身炎症反应的综合征，其中肺部往往是最早遭受侵害的关键器官，其受累比例介于

83%至100%之间,该过程可引发ALI/ARDS,严重者可能进展为MODS^[8,9]。研究指出^[10],炎症反应失衡是ALI的关键因素之一,在临床治疗上,以感染控制为基础的治疗手段是主流,尽管在抗菌治疗和器官保护方面已实现了显著进展,但截至现在,ALI/ARDS的死亡率依旧维持在30%至40%的高水平^[11]。右美托咪定(DEX)是 $\alpha 2$ -肾上腺素受体选择性激动剂,展现出镇静、镇痛和催眠效果,同时不伴有呼吸抑制的独特性质。尤其在脓毒症并发急性肺损伤并行呼吸机治疗的病患中,其作用尤为显著。此外,DEX还拥有抗炎、清除自由基和防护肺部损伤的特殊功能,有助于降低呼吸机相关性的肺损伤程度^[12,13]。

肺水肿是ALI的重要表现之一,右美托咪定能够降低肺湿/干质量比,本文研究结果显示,观察组在各时间点的W/D比值、肺损伤评分和MPO活力高于对照组。由此说明它能够通过减少肺组织内的液体聚集,减轻肺水肿,从而改善肺组织的功能状态。

右美托咪定对炎症反应具有显著的调节作用,IL-1 β 、TNF- α 和IL-6等炎症因子是ALI炎症反应的重要标志物,它们的升高会加剧肺组织的炎症反应和损伤^[14,15]。本文结果显示,观察组的IL-6、IL-1 β 、TNF- α 浓度以及IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的mRNA转录水平均较对照组显著升高;此外,观察

组中L-1 β 、TNF- α 、IL-6的GAPDH蛋白表达量亦高于对照组($P < 0.05$)。表明右美托咪定抑制交感神经系统,实现活性调节,减少这些炎症细胞的激活,从而降低其对肺组织的损伤,它可能通过抑制GSK-3 β /STAT3-NF- κ B信号传导途径,阻断NF- κ B转录,从而减少炎症介质和细胞因子的释放。

本文结果显示,观察组p-GSK-31 β / GSK-3 β 蛋白、p-STAT3 / STAT3蛋白、p-NF-KB / NF-KB蛋白表达水平高于对照组。首先,右美托咪定可能通过作用于 $\alpha 2$ -肾上腺素受体,影响GSK-3 β 的活性。在正常情况下,GSK-3 β 参与构成降解复合物,维持细胞内蛋白水平稳定。而在ALI状态下,GSK-3 β 的活性异常,右美托咪定可能通过调节其活性,恢复其正常功能,进而影响下游信号分子的传导。对于STAT3,右美托咪定可能通过抑制其磷酸化水平,减少其进入细胞核内,从而降低其对炎症相关基因的表达促进作用。NF- κ B作为关键的转录因子,右美托咪定可能通过抑制其激活,减少炎症介质的表达。

综上所述,右美托咪定有助于降低ALI大鼠模型中肺组织的湿干比重,从而减轻肺部的水肿及炎症反应。此外,右美托咪定还能抑制GSK-3 β 、STAT3、NF- κ B蛋白表达,调控GSK-3 β /STAT3-NF- κ B信号通路,从而发挥保护作用。

参考文献

- [1]曹军涛,胡杰,陈兴澎,等.右美托咪定预处理对脂多糖致大鼠急性肺损伤时高迁移率族蛋白1的影响[J].中华实验外科杂志,2023,40(8):1500-1503.
- [2]白毅平,江伟哲,李富裕,等.右美托咪定通过抑制NF- κ B及炎症因子减轻失血性休克大鼠急性肺损伤[J].检验医学与临床,2023,20(11):1560-1563.
- [3]Qiu Y, Tang Z. Dexmedetomidine Attenuates LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats by Activating the Nrf2/ARE Pathway. J Healthc Eng. 2022 Apr 11;2022:4185195.
- [4]Zhang ZM, Li LZ, Li KH, et al. The effects of dexmedetomidine administered at various times on acute lung injury in rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2021 Feb;25(4):2093-2098.
- [5]宋添力,唐浪,王一民,等.竹节参多糖通过PI3K/AKT/NF- κ B信号通路对急性肝损伤大鼠的影响[J].精细化工,2023,40(11):2472-2479,2534.
- [6]韩冰,陈梦婷,杨传铭,等.右美托咪定预处理通过抑制NLRP3炎性小体激活减轻大鼠肠缺血再灌注诱导的急性肺损伤[J].南方医科大学学报,2021,41(12):1857-1863.
- [7]王鹏程,王震,代彦文,等.右美托咪定通过调控SIGIRR/NF- κ B信号对脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤的影响[J].中国药理学通报,2021,37(8):1076-1080.
- [8]何旋,陈鹤翔,孔倩,等.艾司氯胺酮对大鼠内毒素性急性肺损伤时TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J].中华麻醉学杂志,2024,44(6):729-732.
- [9]裴志龙,张丽萍,邢健.miR-126调控MAPK/NF- κ B信号通路对急性肺损伤大鼠的干预效果[J].河北医药,2024,46(23):3525-3528,3533.
- [10]汤建华,刘克勤,姜爱雯,等.lncRNA XIST通过NF- κ B/NLRP3炎性体通路影响急性肺损伤大鼠炎症反应和细胞凋亡[J].中国老年学杂志,2023,43(1):115-119.
- [11]赵诗雯,张宗泽.右美托咪定预处理抑制NLRP3炎性体活性减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤[J].武汉大学学报(医学版),2020,41(4):578-582.
- [12]Chen X, Sun Z, Zhang H, et al. Correlation of Impaired NF- κ B Activation in Sepsis-Induced Acute Lung Injury (ALI) in Diabetic Rats. J Healthc Eng. 2021 Nov 30;2021:5657284.
- [13]Sun Y, Xia Y, Liu X, et al. Dexmedetomidine alleviates LPS-induced acute lung injury via regulation of the p38/HO1 pathway. Mol Med Rep. 2020 Sep;22(3):2442-2450.
- [14]Li Y, Wu B, Hu C, et al. The role of the vagus nerve on dexmedetomidine promoting survival and lung protection in a sepsis model in rats. Eur J Pharmacol. 2022 Jan 5;914:174668.
- [15]王鹏程,杨扬,崔明珠,等.右美托咪定对大鼠内毒素性急性肺损伤时细胞焦亡的影响[J].中华麻醉学杂志,2021,41(11):1392-1395.