DOI:10.16016/j.1000-5404.201409078

论著

右美托咪定对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的影响及其机制

王中权,王 府,冉龙宽,田泽丹,陈玉培 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院麻醉科)

[摘要] **目的** 观察右美托咪定对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的影响,并探讨其可能的机制。**方法** 96只成年SD大鼠按随机数字表法分为4组($n=24$):假手术组(S组)、缺血再灌注组(IR组)、缺血再灌注右美托咪定组(DEX组)和缺血再灌注右美托咪定+育亨宾组(DY组),每组再分为灌注后12、24、48、72 h 4个亚组($n=6$)。采用临床常用的首次负荷量加持续微量泵给药方式予以右美托咪定和育亨宾处理,并通过改良Zivin法阻断双肾间腹主动脉建立脊髓缺血再灌注损伤模型,采用BBB法对大鼠运动功能评分,HE染色观察大鼠脊髓病理学改变($L_4 \sim L_6$),免疫组化观察脊髓Bax、Bcl-2表达,采用TUNEL法计数脊髓细胞凋亡率,Western blot检测Caspase3表达。**结果** 与IR组比较,DEX组和DY组BBB运动评分升高,HE染色病理损伤明显减轻,TUNEL染色细胞凋亡率下降,免疫组化Bcl-2升高,Bax降低($P<0.05$),Western blot显示Caspase3表达减少;与DEX组比较,DY组BBB运动评分降低,HE染色病理损伤加重,TUNEL染色细胞凋亡率升高,免疫组化Bcl-2降低,Bax升高($P<0.05$),Western blot检测结果显示Caspase3表达增加。**结论** 右美托咪定对大鼠脊髓缺血再灌注损伤具有明显的保护效应,其机制与激动α_2肾上腺素受体,增加FAK磷酸化,并上调Bcl-2表达,下调Bax和Caspase3表达的抗细胞凋亡作用有关。

[关键词] 缺血再灌注损伤;右美托咪定;育亨宾;脊髓
[中图法分类号] R364.12; R651.2; R971.2 [文献标志码] A

Effect of dexmedetomidine on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats

Wang Zhongquan, Wang Fu, Ran Longkuan, Tian Zedan, Chen Yupei (Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of dexmedetomidine on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats, and explore possible mechanism. **Methods** A random number table method was used to divide 96 adult SD rats into 4 groups ($n=24$): sham-operation group (S), ischemia-reperfusion group (IR), dexmedetomidine treatment group (DEX), and dexmedetomidine and yohimbine combination treatment group (DY). Each group was further divided into 4 subgroups ($n=6$) according to time points (12, 24, 48 and 72 h) after ischemia-reperfusion injury. After the spinal cord ischemia-reperfusion injury model was established with an improved Zivin method, the motion function of the hind limbs was evaluated by BBB scale, and the pathological changes in L_4-L_6 spinal cords were observed by HE staining. The expression of Bcl-2 and Bax was examined by immunohistochemical staining, and the expression of Caspase 3 was detected by Western blotting. Meanwhile, the apoptotic rate of spinal cord cells was calculated by TUNEL assay. **Results** Compared with group IR, group DEX and group DY showed higher motion function scores, less pathological injury, lower expression of Bax and Caspase 3, higher expression of Bcl-2, and lower apoptotic rate ($P<0.05$). Compared with group DY, group DEX had better outcomes in the above indexes. **Conclusion** Dexmedetomidine has neuroprotective effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury through activation of α_2-adrenoreceptors, phosphorylation of FAK, up-regulation of Bcl-2, and down-regulation of Bax and Caspase 3.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172122)
[通信作者] 陈玉培,E-mail:963043115@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1430.020.html(2014-12-08)

[**Key words**] ischemia-reperfusion injury; dexmedetomidine; yohimbine; spinal cord

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172122). Corresponding author: Chen Yupei, E-mail: 963043115@qq.com

脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemic-reperfusion injury,SCIRI)表现为脊髓功能进行性的且发展迅速的丧失,是脊柱手术和动脉瘤等手术后患者严重致残和死亡的重要原因。目前SCIRI尚无有效干预措施,疗效亦欠佳。右美托咪定(dexmedetomidine,DEX)具有镇静、镇痛、抗焦虑、利尿等作用,近年来广泛应用于临床麻醉[1-3]。研究发现,DEX作为α_2受体激动剂具有多器官保护作用[4-7],涉及心、脑和肾脏多个器官。Bell等[8-9]在一项DEX对脊髓缺血再灌注损伤研究中发现DEX对SCIRI也具有保护作用,但其机制尚不清楚。本研究主要探讨DEX对SCIRI的作用及其机制,旨在为SCIRI的防治策略及机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

健康成年SD大鼠96只(雌雄不限),体质量(200±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。盐酸右美托咪定注射液(200 μg:2 mL;江苏恒瑞医药股份有限公司,批号13122432),盐酸育亨宾(西安天宝生物科技有限公司,批号TB20140121),兔源Bcl-2多克隆抗体(Proteintech生物公司,货号12789-1-AP),兔源Bax多克隆抗体(Proteintech生物公司,货号50599-2-lg),兔源Caspase3多克隆抗体(Proteintech生物公司,货号19677-1-AP),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(碧云天生物技术研究所进口分装,编号A0208),TUNEL试剂盒(美国Roche公司)。

1.2 大鼠脊髓缺血再灌注模型制作

根据改良Zivin法[10-11]建立脊髓缺血再灌注模型,按大鼠体质量腹腔注射10%水合氯醛0.4 mL/100 g麻醉,头皮针尾静脉穿刺置管,将大鼠仰卧位固定,腹部常规脱毛后消毒,然后沿腹白线剖开腹腔,将肠管向左推,分离暴露出腹主动脉并仔细辨认双侧肾动脉,在左、右肾动脉之间穿线后,以无创动脉夹阻断腹主动脉,缺血45 min后松夹恢复血液灌注,最后逐层关闭腹腔并腹腔注射5万U青霉素,术中用烤灯维持肛温36 ℃左右,术后常规饲养。模型成功标准:①缺血:腹主动脉阻断部位以下的动脉搏动消失,大鼠后肢苍白;②再灌注:松开动脉夹后,大鼠后肢转为红润;③大鼠能正常进食,前肢功能正常,双后肢瘫痪,伴不同程度的大小便功能障碍。

1.3 实验分组与处理

将96只SD大鼠按随机数字表法分为4组(n=24):①假手术组(S组):只行手术操作,不阻断腹主动脉。经尾静脉缓慢注射生理盐水3 mL/kg 5 min后再以3 mL/(kg·h)连续泵注120 min;②缺血再灌注组(IR组):经尾静脉缓慢注射生理盐水3 mL/kg 5 min后阻断腹主动脉,并再以生理盐水3 mL/(kg·h)连续泵注120 min;③缺血再灌注右美托咪定组(DEX组):经尾静脉缓慢注射DEX 3 μg/kg 5 min后阻断腹主动脉,并再以DEX 3 μg/(kg·h)连续泵注120 min;④缺血再灌注右美托咪定+育亨宾组(DY组):经尾静脉缓慢注射DEX 3 μg/kg+育亨宾3 μg/kg 5 min后阻断腹主动脉,并再以DEX 3 μg/(kg·h)+育亨宾3 μg/(kg·h)连续泵注120 min。

每组分为再灌注后12、24、48、72 h 4个亚组(n=6),各组大鼠均于上述各时间点在麻醉下断头处死,采用后部正中切口,分离取出脊髓L_2~L_6节段。L_2~L_3节段留做Westren blot检测,L_4~L_6以4%多聚甲醛固定,脱水,包埋,切片备检。

1.4 观察指标

1.4.1 大鼠运动功能评分 对每组大鼠采用Basso的BBB评分法[12]分别在缺血再灌注后12、24、48、72 h对大鼠后肢运动功能评分。

1.4.2 脊髓组织病理学改变 HE染色并于光镜下观察比较各组脊髓组织病理学改变。光镜下正常脊髓神经元清晰,呈现多极性,核仁清楚,可见清晰的树突与轴突,无水肿出血,未见中性粒细胞浸润等。神经元损伤则表现为不同程度细胞肿胀,周围间隙增宽出血,空泡形成,中性粒细胞浸润等。根据文献[13]计数正常神经元和损伤神经元,计算运动神经元异常率=每张切片的异常运动神经元数/该切片中运动神经元总数×100%。

1.4.3 细胞凋亡率检测 采用TUNEL法检测细胞凋亡率,即凋亡细胞占神经细胞总数的百分比。将石蜡切片二甲苯脱蜡梯度酒精水化,PBS冲洗,蛋白酶K 37 ℃消化30 min,PBS冲洗,玻片干后滴加50 μL TUNEL反应混合液(50 μL脱氧核糖核苷酸转移酶+450 μL荧光素标记的dUTP)并在暗湿盒37 ℃反应1 h,PBS冲洗,玻片干后滴加50 μL标记荧光素抗体的HRP 37 ℃孵育30 min,PBS冲洗后DAB显色,苏木精复染、脱水、中性树脂封片。

1.4.4 免疫组化检测Bcl-2、Bax表达 将石蜡切

片常规脱蜡水化，沸水修复抗原，PBS 冲洗，滴加正常山羊血清封闭液室温 20 min，滴加一抗 Bcl-2、Bax 兔源多克隆抗体室温静置 1 h，PBS 冲洗，滴加二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 室温静置 1 h，PBS 冲洗，DAB 显色 5～10 min，PBS 冲洗后，苏木精复染、脱水、中性树脂封片。

1.4.5 Western blot 检测 Caspase3 表达 将 L_2～L_3 段脊髓放入 2 mL EP 管中并加入 2 粒钢珠和 1 mL 裂解液 RIPA（含 PI），放入研磨仪中（70 Hz，2 min，4 次）后冰上静置 15 min，离心机离心并挑除沉淀，使用 BCA 法测量蛋白浓度后取 30 μg 蛋白变性，配制 12% SDS-PDGE 胶加样与蛋白 Marker，加样后的胶置入电泳仪（120 V，1.5 h）跑胶，电泳仪中转膜（90 V，3 h），将硝酸纤维素膜取出放入 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h，加入一抗兔源 Caspase3 多克隆抗体 5 μL 并置入摇床 4 ℃过夜，加入 5% 脱脂牛奶 5 mL 和 1.7 μL 二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 并置入摇床室温 2 h，加入 HRP 酶促化学发光底物液，最后通过胶片显影观察结果。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用两独立样本均数 t 验，多组间两两比较用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠各时间点的 BBB 评分

各组大鼠术后 12、24、48、72 h BBB 评分见表 1。各时间点与 S 组比较，IR 组、DEX 组和 DY 组 BBB 评分明显降低（$P<0.01$），其中 DEX 组 > DY 组 > IR 组，各组间差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

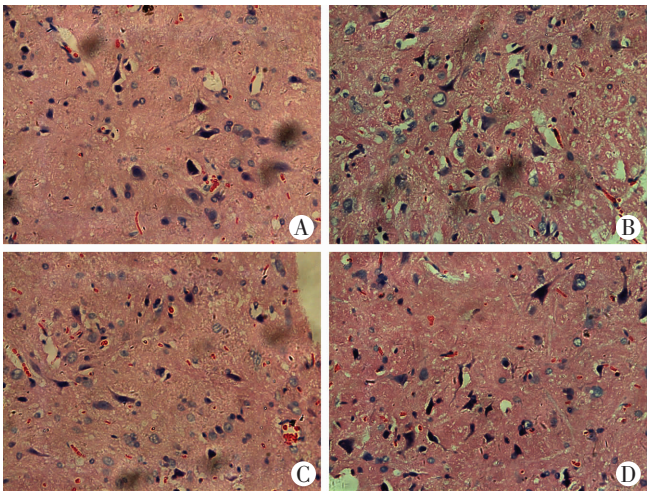
表 1 各组大鼠不同时间点 BBB 评分比较（分，$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
S 组	21.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0
IR 组	12.7 ± 0.8[a]	12.2 ± 0.8[a]	11.8 ± 0.4[a]	13.2 ± 0.8[a]
DEX 组	17.2 ± 0.8[ab]	16.3 ± 0.5[ab]	15.5 ± 0.5[ab]	16.3 ± 0.5[ab]
DY 组	14.2 ± 0.8[abc]	13.7 ± 0.5[abc]	13.3 ± 0.5[abc]	14.5 ± 0.5[abc]

a：$P<0.01$，与 S 组比较；b：$P<0.05$，与 IR 组比较；c：$P<0.05$，与 DEX 组比较

2.2 各组大鼠脊髓病理学变化

光镜下见 S 组脊髓前角神经元清晰，呈现多极性，核仁清楚，可见清晰的树突与轴突，无水肿出血，未见中性粒细胞浸润等。IR 组神经元肿胀明显，神经元周围间隙增加，可见较多的神经元坏死，空泡形成，中性粒细胞浸润。与 IR 组比较，DEX 组和 DY 组神经元损伤较轻，见图 1。S 组各时点运动神经元异常率为 0，IR 组、DEX 组和 DY 组运动神经异常率明显升高，其中 IR 组 > DY 组 > DEX 组，组间比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2。



A：S 组；B：IR 组；C：DEX 组；D：DY 组

图 1 缺血再灌注后 48 h 各组大鼠脊髓病理学观察（HE ×400）

表 2 各组大鼠脊髓各时间点运动神经元异常率比较

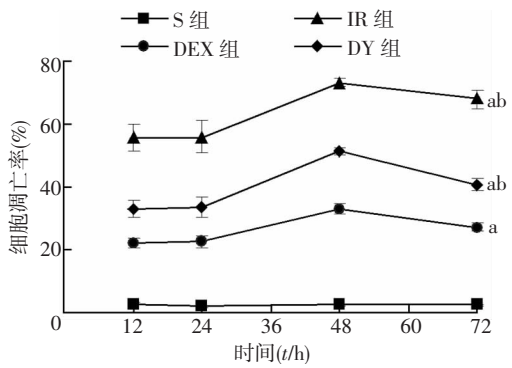
［$n=6$，$(\bar{x} \pm s)\%$］

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
S 组	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
IR 组	62 ± 2	65 ± 2	69 ± 3	65 ± 2
DEX 组	49 ± 3[a]	47 ± 2[a]	53 ± 3[a]	51 ± 3[a]
DY 组	55 ± 2[ab]	53 ± 2[ab]	67 ± 3[ab]	67 ± 3[ab]

a：$P<0.05$，与 IR 组比较；b：$P<0.05$，与 DEX 组比较

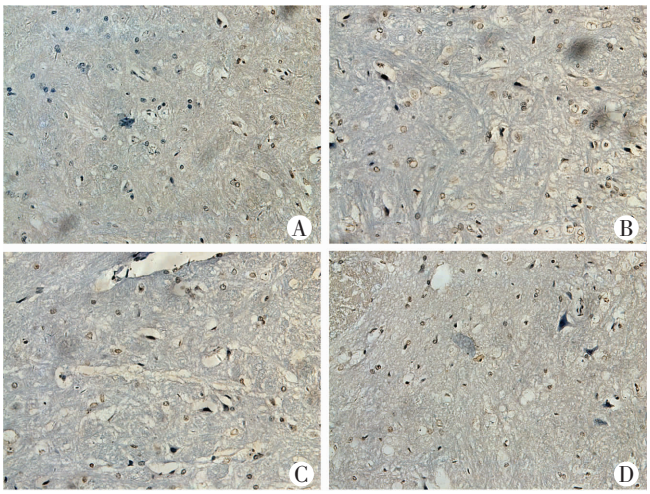
2.3 各组大鼠脊髓各时间点的细胞凋亡率变化

TUNEL 法检测细胞凋亡阳性细胞核为棕黄色，而正常细胞核显示蓝紫色。与 S 组比较，IR 组、DEX 组和 DY 组细胞凋亡率明显升高（$P<0.01$），其中凋亡率 IR 组 > DY 组 > DEX 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。各组细胞凋亡随缺血后时间逐渐升高，48 h 达到凋亡高峰（图 2、3）。



a：$P<0.01$，与 S 组比较；b：$P<0.05$，与 DEX 组比较

图 2 各组大鼠缺血再灌注后不同时间点神经细胞凋亡率变化



A:S组;B:IR组;C:DEX组;D:DY组

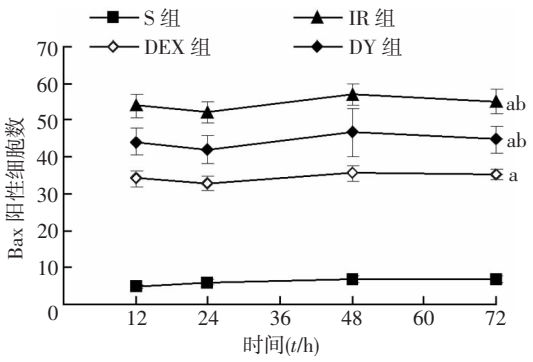
图3 TUNEL染色观察各组大鼠脊髓缺血再灌注48 h后变化 (×400)

2.4 各组大鼠脊髓细胞的Bax和Bcl-2表达水平变化

Bax和Bcl-2免疫组化检测阳性细胞的细胞质呈棕黄色,正常细胞质不染色。各组大鼠各时间点脊髓细胞Bax和Bcl-2表达水平较S组均明显升高($P<0.01$),其中Bax蛋白表达IR组>DY组>DEX组,Bcl-2蛋白表达DEX组>DY组>IR组,差异有统计学意义($P<0.05$,图4~7)。

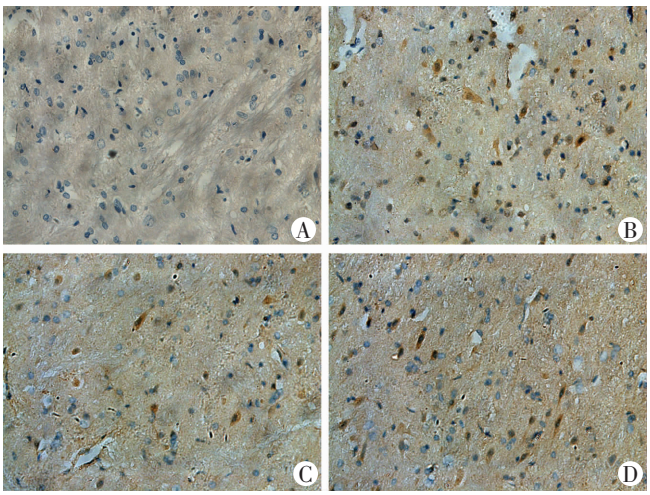
2.5 各组大鼠脊髓Caspase3表达水平变化

通过Image J软件测定各条带灰度值,并计算出各Caspase3目标条带与β-actin内参条带灰度值比,与S组比较,IR组、DEX组和DY组各时点大鼠脊髓Caspase3蛋白表达均明显升高,于再灌注后48 h S组脊髓Caspase3灰度值比为5.7%,而DEX组为23.4%,DY组为64.8%,IR组为84.5%。见图8。



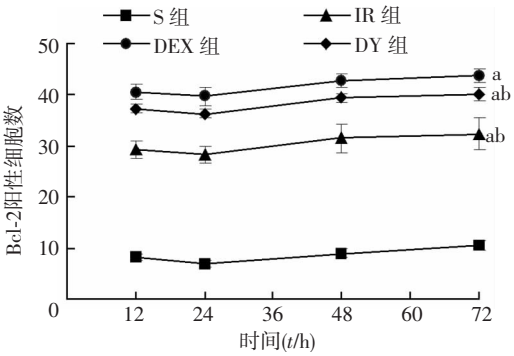
a:$P<0.01$,与S组比较;b:$P<0.05$,与DEX组比较

图4 各组缺血再灌注后不同时间点Bax阳性细胞数变化



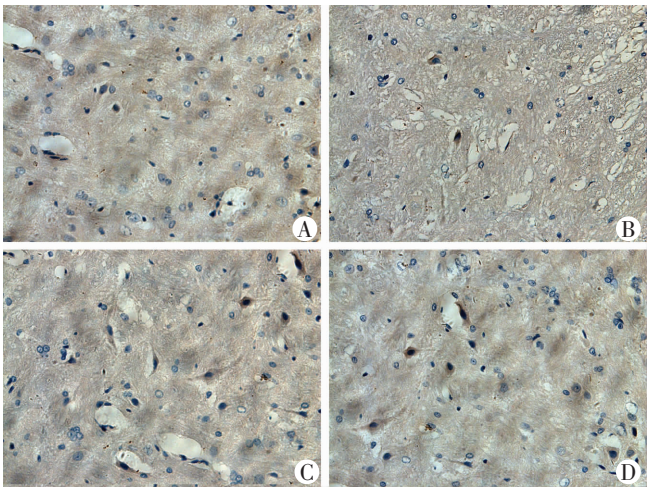
A:S组;B:IR组;C:DEX组;D:DY组

图5 免疫组化检测各组缺血再灌注后48 h脊髓Bax表达 (×400)



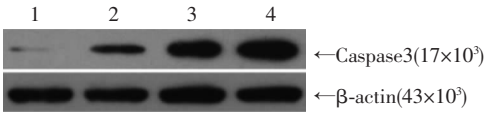
a:$P<0.01$,与S组比较;b:$P<0.05$,与DEX组比较

图6 各组缺血再灌注后不同时间点Bcl-2阳性细胞数变化



A:S组;B:IR组;C:DEX组;D:DY组

图7 免疫组化检测各组缺血再灌注48 h后脊髓Bcl-2表达(×400)



1:S 组;2:DEX 组;3:DY 组;4:IR 组

图 8 Western blot 检测各组缺血再灌注后 48 h 脊髓 Caspase3 表达

3 讨论

SCIRI 是脊髓损伤后恢复的一个重要障碍,往往对神经细胞造成严重的损伤,是脊柱手术和动脉瘤等手术后患者严重致残和死亡的重要原因。本研究采用临床常用的首次负荷量加持续微量泵给药方式予以右美托咪定和育亨宾处理,并通过与外科动脉瘤手术相似的改良 Zivin 法阻断大鼠腹主动脉建立脊髓缺血再灌注损伤模型。

SCIRI 病理生理过程复杂,主要包括细胞内 Ca^{2+} 超载、自由基损伤、脂质过氧化反应、兴奋性氨基酸毒性、炎症反应、细胞凋亡[14]等,1998 年 Sakurai 等[15]建立兔脊髓缺血 15 min 再灌注损伤模型,利用 TUNEL 染色发现脊髓前角运动神经元存在凋亡现象,推断细胞凋亡可能是 SCIRI 后引起运动神经元死亡并导致动物肢体瘫痪的重要原因,其危害可能甚至超过细胞坏死。因此,我们推测 DEX 对 SCIRI 的保护作用可能与抗细胞凋亡相关,并通过连续检测缺血再灌注损伤后 4 个时间点凋亡相关蛋白 Caspase3、Bax 和 Bcl-2 的表达变化来研究 DEX 对 SCIRI 的作用。其中 Caspase3 作为多种凋亡途径的共同作用点,是凋亡过程中的关键因子,是细胞凋亡的必经之路。Bcl-2 家族蛋白对于线粒体通透性转换孔(mitochondria permeability transition pore,MPTP)的开放和关闭起关键的调节作用,促凋亡蛋白 Bax 可介导 MPTP 的开放,抗凋亡蛋白 Bcl-2 可阻止 Bax 介导 MPTP 的开放而发挥抗凋亡效应。MPTP 开放会引起线粒体跨膜电位下降和细胞色素 C(cytochrome C,CytC;apoptotic protease activating factor-2,Apaf-2)释放,释放到细胞质的 CytC 能引起 Apaf-1 多聚化而激活。Apaf-1 具有激活 Caspase3 的作用,从而启动 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡。本研究显示脊髓缺血再灌注损伤后各组脊髓促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase3 表达均明显升高并于 48 h 达到高峰,脊髓神经细胞凋亡率也于 48 h 达高峰。与 IR 组比较,DEX 组各时间点 Bax 和 Caspase3 表达低,Bcl-2 表达高,神经细胞凋亡少,大鼠脊髓缺血再灌注损伤明显减轻。此外我们还发现 DEX 处理的同时给予 α_2受体阻滞剂育亨宾,脊髓神经细胞凋亡率升高,DEX 的神经保护作用明显减弱,因此我们认为 DEX 也能直接通过激动 α_2受体[16],减少腺苷酸环化酶激活,增加磷酸化的黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)含量发挥神经保护作用[17],同时右美托咪定能增加脊髓缺血再灌注损伤后抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 表达,减少促细胞凋亡蛋白 BAX 和 Caspase3 表达。Bell 等[8-9]研究发现 DEX 对 SCIRI 神经保护作用也与其促进腺苷反应元件结合蛋白(cyclic AMP response-element binding protein,CREB)磷酸化有关,Zhu 等[7]研究则认为 DEX 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用与其介导 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路有关。

综上所述,DEX 对 SCIRI 的保护效应主要与其激动 α_2受体,并同时上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 和 Caspase3 表达的抗凋亡作用有关。本研究初步探讨了 DEX 对 SCIRI 的保护机制,并揭示了脊髓缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡规律,为临床中脊髓缺血再灌注损伤防治使用 DEX 提供实验依据。另外,DEX 对 SCIRI 的保护效应尚有其他机制参与,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Rutkowska K, Knapik P, Msiolek H. The effect of dexmedetomidine sedation on brachial plexus block in patients with end-stage renal desease[J]. Eur J Anaesthesiol, 2009, 26(10): 851-855.

[2] Tan J A, Ho K M. Use of dexmedetomidine as a sedative and analgesic agent in critically ill adult patients: a meta-analysis[J]. Intensive Care Med, 2010, 36(6): 926-939.

[3] 李然, 许幸, 吴新民, 等. 右美托咪定对高血压患者全麻恢复期气管拔管反应的影响:多中心、随机、盲法、安慰剂对照临床研究[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(4): 397-401.

[4] Sugita S, Okabe T, Sakamoto A. Continuous infusion of dexmedetomidine improves renal ischemia-reperfusion injury in rat kidney[J]. J Nippon Med Sch, 2013, 80(2): 131-139.

[5] Kilic K, Hanci V, Selek S, *et al*. The effects of dexmedetomidine on mesenteric arterial occlusion-associated gut ischemia and reperfusion-induced gut and kidney injury in rabbits[J]. J Surg Res, 2012, 178(1): 223-232.

[6] Hanci V, Erol B, Bektas S, *et al*. Effect of dexmedetomidine on testicular torsion/detorsion damage in rats[J]. Urol Int, 2010, 84(1): 105-111.

[7] Zhu Y M, Wang C C, Chen L, *et al*. Both PI3K/Akt and ERK1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Brain Res, 2013, 1494: 1-8.

[8] Bell M T, Puskas F, Smith P D, *et al*. Attenuation of spinal cord ischemia-reperfusion injury by specific α-2a receptor activation with dexmedetomidine[J]. J Vasc Surg, 2012, 56(5): 1398-1402.

[9] Bell M T, Puskas F, Bennett D T, *et al*. Dexmedetomidine, an α-2a adrenergic agonist, promotes ischemic tolerance in a murine model of spinal cord ischemia-reperfusion[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 147(1): 500-506.

[10] Zivin J A, DeGirolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model[J]. Stroke, 1980, 11(2): 200-202.

[11] 曾小华, 刘丹彦, 安民. 胞二磷胆碱预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011,

33(24): 2587-2591.
[12] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
[13] 方华, 王泉云, 李昌熙, 等. 脊髓分级缺血再灌注损伤模型的建立与病理学评价[J]. 四川动物, 2007, 26(3): 689-692.
[14] Kiyoshima T, Fukuda S, Matsumoto M, *et al*. Lack of evidence for apoptosis as a cause of delayed onset paraplegia after spinal cord ischemia in rabbits [J]. Anesth Analg, 2003, 96(3): 839-846.
[15] Sakurai M, Hayashi T, Abe K, *et al*. Delayed and selective motor neuron death after transient spinal cord ischemia: a role of apoptosis? [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 115(6): 1310-1315.
[16] Schoeler M, Loetscher P D, Rossaint R, *et al*. Dexmedetomidine is neuroprotective in an *in vitro* model for traumatic brain injury[J]. BMC Neurol, 2012, 12: 20.
[17] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, *et al*. Effects of dexmedetomidine on hippocampal focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in physiologic and ischemic conditions[J]. Anesthesiology, 2005, 103(5): 969-977.

(**收稿**:2014-09-11;**修回**:2014-11-16)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409153

异丙酚对大鼠脑缺血再灌注脑组织紧密连接蛋白 MMP-2、MMP-9 表达的影响

王进全,曹 剑,王恩琴 (400038 重庆,第三军医大学西南医院麻醉科)

[**关键词**] 异丙酚; MMP-2; MMP-9; 紧密连接蛋白
[**中图法分类号**] R971.2 [**文献标志码**] B

溶栓是缺血性脑血管病发生后能够治疗成功的关键,溶栓后易造成脑水肿及脑缺血再灌注性损伤。如何降低脑缺血再灌注对脑组织的损伤成为国内外学者的研究焦点[1]。脑微血管紧密连接为血脑屏障的主要结构基础,可有效阻止细菌入侵脑组织,从而保护脑组织[2]。但血脑屏障的保护作用大大降低了药物对脑组织损伤的治疗。临床研究显示,全麻药异丙酚可以降低缺血性脑损伤后血脑屏障通透性、脑血管事件的发生率,但对其脑保护的作用机制尚不清楚。研究发现组织紧密连接蛋白 MMP-2、MMP-9 在脑缺血性损伤后表达显著升高,参与血脑屏障的破坏,加剧缺血后的脑损伤[2]。本实验观察异丙酚对 SD 大鼠脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白 MMP-2、MMP-9 表达的影响,探讨异丙酚对脑组织的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及设备、试剂来源

8 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠 80 只,体质量 240~280 g(购于中国医科大学实验动物中心)。大鼠按随机编号分为 5 组:A 组为假手术组($n=10$);B 组为正常组($n=10$);C 组:缺血 6、12 h 50 mg/kg 异丙酚预处理组(每个时间点 10 只);D 组:缺血 6、12 h 100 mg/kg 异丙酚治疗组(每个时间点 10 只);E 组:缺血 6、12 h 再灌注组(每个时间点 10 只)。酶联免疫吸附法的仪器由郑州安图绿科有限公司提供;药品异丙酚由阿斯利康公司提供;MMP-2、MMP-9 检测试剂盒由晶美生物工程有限公司提供。Mias 图像分析系统由上海交通大学图像分析研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 缺血再灌注动物模型制作方法 参照文献[3]对大鼠进行大脑中动脉线栓后缺血再灌注造模:将大鼠腹腔麻醉后,暴露分离左侧颈内总动脉,插入线栓、结扎,建立大脑中动脉缺血模型,假手术组插入线栓不结扎,正常组不予任何处理;预处理组于结扎前给予异丙酚;治疗组于结扎后给予异丙酚;缺血再灌注组进行正常手术。

1.2.2 干预方法 实验大鼠于再灌注后 6、12 h,分别采用 3.5% 水合氯醛、异丙酚进行干预,而后断头取脑,经速冻 20 min 后。从视交叉向后连续冠状切片,片厚 2 mm。将脑片放入 2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液,37 ℃温箱中染色 30 min,15 min 翻面,甲醛固定 24 h 后,见正常脑组织呈红色,梗死灶则为白色。梗死体积 = 各层梗死面积之和 × 层面厚度。

1.2.3 制作脑组织匀浆 断头取全脑,加入生理盐水中制成 10% 的脑组织匀浆备用,所有的脑组织匀浆采用 ELISA 法测定蛋白量 MMP-2 和 MMP-9 的含量。同组大鼠经麻醉后打开胸腔,经升主动脉段快速灌注生理盐水,直至右心房流出液清亮为止,采用 4% 的多聚甲醛 150 mL 灌注固定,断头取脑,将大脑组织置于 4% 的甲醛溶液中固定,采用免疫组织化学法检测各组

(下转 442 页)

[**基金项目**] 重庆市基础与前沿研究计划项目(CSTC2014jcyjA1694)
[**通信作者**] 王恩琴,E-mail: 448041475@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1638.015.html(2014-12-04)