

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.36.001

右美托咪定联合远程缺血后处理增强脑保护效应的研究*

李 刚,王 袁,赵娇妹,吴刚明,欧册华,魏继承

(泸州医学院附属医院麻醉科,四川泸州 646000)

摘要:目的 评价右美托咪定(DEX)联合肢体远程缺血后处理对减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 将健康雄性成年 SD 大鼠分为 4 组:对照组(C 组)、远程缺血后处理组(R 组)、DEX 后处理组(D 组)和联合处理组(R/D 组)。采用大脑中动脉阻断法制备大鼠局灶性脑缺血模型。C 组作大脑中动脉阻断模型,分离左股动脉但不予阻断;R 组脑缺血 120 min,恢复再灌注前予以左股动脉钳夹 10 min、再灌注 10 min 共 3 个循环;D 组恢复再灌注前 15 min 腹腔注射盐酸右美托咪定 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$;R/D 组联合上述两种处理方法。各组于再灌注 24 h 作 Longa 神经功能评分,再灌注 48 h 处死大鼠,测定脑梗死容积。结果 再灌注 24 h D、R、R/D 组神经功能评分均优于 C 组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);再灌注 48 h 大鼠脑梗死容积百分比 D、R、R/D 组均较 C 组显著降低(均 $P < 0.01$);R/D 组与 R 组比较,梗死区体积百分比显著降低($P < 0.01$);R/D 组与 D 组比较,梗死区体积百分比降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 盐酸右美托咪定和肢体远程缺血后处理都可以减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤,二者联合应用能更显著地减小脑梗死容积,具有协同保护效应。

关键词:脑缺血;脑保护;再灌注损伤;远程缺血后处理;右美托咪定

中图分类号:R971.93;R743.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)36-4849-03

Study on dexmedetomidine combined with remote ischemic postconditioning for enhancing cerebral protective effect*

Li Gang, Wang Yuan, Zhao Jiaomei, Wu Gangming, Ou Cehua, Wei Jicheng

(Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical Collage, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the the protectice effect of dexmedetomidine combined limb remote ischemic postcondition on alleviating focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats. **Methods** 48 healthy adult male SD rats were randomly divided into 4 groups($n = 12$): control group(C), limb remote ischemic postcondition group(R) and dexmedetomidine postconditioning group(D) and combination group(R/D). The rat model of focal cerebral ischemic reperfusion injury was induced by middle cerebral artery occlusion(MCAO). The group C only received MCAO, the left femoral artery was isolated without blocking; the group R received 120 min brain ischemia, the left femoral artery was occluded by 3 cycles of 10 min occlusion/10 min reperfusion before brain reperfusion; the group D received dexmedetomidine 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by intraperitoneal injection before brain reperfusion. The group R/D combined the above two kinds of processing method. The neurologic function was evaluated at 24 h of reperfusion and then the rats were sacrificed at 48 h of reperfusion. The brain was removed for determining the cerebral infarct volume. **Results** The neurologic function scores after 24 h reperfusion in the group D, R and R/D were superior to those in the group C ($P < 0.01$). The rat cerebral infarct volume percentages after 48 h reperfusion in the group D, R and R/D were significantly lower than those in the group C ($P < 0.01$). The infarct area volume percentage in the group R/D was significantly lower than that in the group R, the difference showed statistical significance($P < 0.01$). The infarct volume percentage in group R/D was significantly decreased compared with the group D($P < 0.05$). **Conclusion** Both dexmedetomidine and limb remote ischemic postcondition can attenuate the focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats. Their combination can significantly reduce the cerebral infarction volume and has synergic protection effect.

Key words: brain ischemia; cerebral protection; reperfusion injury; remote ischemic postcondition; dexmedetomidine

脑卒中已成为当今威胁人类生命安全和致残的首要原因。如何预防和减少卒中引起的脑损害,仍是目前研究的热点。远程缺血后处理是近年来发现的一种脑保护措施^[1]。研究发现,右美托咪定(DEX)也具有脑保护作用^[2]。那么,二者联合是否具有协同保护效应呢?本实验采用大鼠大脑中动脉栓塞模型,研究肢体远程缺血后处理联合 DEX 对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方

1.1 实验动物 将雄性 SD 大鼠(由泸州医学院动物中心提供)分为 4 组:对照组(C 组)、远程缺血后处理组(R 组)、DEX 后处理组(D 组)、联合处理组(R/D 组),剔除模型失败和观察期内死亡的大鼠,每组 12 只。

1.2 方法

1.2.1 线栓法制备大鼠大脑中动脉阻断模型(MCAO) 参照

* 基金项目:四川省卫生计生厅资助项目(110353);泸州医学院附属医院科研资助项目(2011-47)。作者简介:李刚(1975—),硕士,副教授,主要从事麻醉与器官保护研究。

1989 年 Longa 等^[3]使用线栓法复制大鼠脑梗死模型。行右侧颈内动脉尼龙线栓法,即动物麻醉后于颈总动脉分叉处下方约 5 mm 处剪一切口后,将一根预先用酒精灯烧成圆头的尼龙线(北京沙东生物技术有限公司)置入颈动脉内约 18~20 mm,阻闭 120 min 后抽出尼龙线,恢复血流再灌注;实验期间维持环境温度,保持大鼠体温为 37.0~37.5℃。

1.2.2 各组处理方法 (1)C 组:制备 MCAO 模型,右侧大脑中动脉缺血 120 min,期间行左股动脉分离手术,恢复再灌注前 15 min 腹腔注射生理盐水 10 mL,恢复再灌注 48 h。(2)R 组:制备 MCAO 模型,右侧大脑中动脉缺血 120 min,期间给予左股动脉钳夹 10 min、再灌注 10 min 共 3 个循环后,恢复再灌注前 15 min 腹腔注射生理盐水 10 mL,恢复再灌注 48 h。(3)D 组:制备 MCAO 模型,右侧大脑中动脉缺血 120 min,期间分离左股动脉,但不予钳夹。恢复再灌注前 15 min 腹腔注射盐酸右美托咪定(批号:12120123,江苏恒瑞药业股份有限公司)3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4](用生理盐水稀释至 10 mL),恢复再灌注 48 h。(4)R/D 组:制备 MCAO 模型,右侧大脑中动脉缺血 120 min,期间予以左股动脉钳夹 10 min、再灌注 10 min 共 3 个循环后,恢复再灌注前 15 min 腹腔注射 DEX 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,恢复再灌注 48 h。

1.3 神经功能缺损评分 动物苏醒后放回鼠笼,自由饮食。脑梗死再灌注后 24 h 行 Longa 神经功能评分(0~4 级):0 级无神经功能缺损表现;1 级对侧前爪不能充分伸展;2 级向外侧转圈;3 级行走时向对侧倾斜;4 级不能行走、意识丧失。

1.4 脑梗死容积测量 大鼠再灌注 48 h 后,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉,断头后迅速取出大鼠脑组织置于冰盐水中 10 min,取冠状面均匀切成 2 mm 厚的脑组织切片,用 20 g/L 的氯化三苯四唑(TTC)溶液染色 20 min,然后用 10% 甲醛缓冲液固定 10 min。24 h 后用数码相机(Canon,日本)拍照,输入计算机,用图像处理软件(Image-pro plus,IPP-6.0)计算脑梗死容积(粉红色为正常脑组织,白色为脑梗死区),所有切片梗死容积之和即为梗死区容积,所有切片标本体积之和即为总体积。脑梗死严重程度是以脑梗死区体积百分比表示,脑梗死区体积百分比=梗死区容积/总体积 \times 100%。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计分析软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验数据经正态检验和方差齐性检验后,方差齐采用 SNK t (Students-Newman-Keuls t) 检验;方差不齐采用多因素方差分析的 Dunnett T_3 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

恢复再灌注 24 h 各组大鼠神经功能评分见表 1。

表 1 4 组大鼠神经功能评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	评分
C 组	12	2.38 \pm 0.744
D 组	12	1.63 \pm 0.916 ^{ab}
R 组	12	1.88 \pm 0.991 ^{abc}
R/D 组	12	1.75 \pm 0.641 ^a

^a: $P<0.01$,与 C 组比较;^b: $P>0.05$,与 R/D 组比较;^c: $P>0.05$,与 D 组比较。

组间对比显示:D、R、R/D 组神经功能评分均优于 C 组,

差异有统计学意义(均 $P<0.01$);D、R 与 R/D 组 3 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。再灌注 48 h 各组大鼠脑梗死容积百分比见表 2。组间对比结果提示:与 C 组相比,D、R、R/D 组的梗死区体积百分比均显著降低(均 $P<0.01$);D 组与 R 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);R/D 组与 R 组比较,梗死区体积百分比显著降低($P<0.01$);R/D 组与 D 组比较,梗死区体积百分比降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 4 组大鼠脑梗死容积比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	梗死容积比
C 组	12	4.47 \pm 0.749
D 组	12	2.75 \pm 0.535 ^{abd}
R 组	12	2.70 \pm 0.267 ^{ac}
R/D 组	12	1.87 \pm 0.433 ^a

^a: $P<0.01$,与 C 组比较;^b: $P>0.05$,与 R 组比较;^c: $P<0.01$,与 R/D 组比较;^d: $P<0.05$,与 R/D 组比较。

3 讨论

远程缺血后处理研究起源于心肌保护领域。随后的研究证实,这种现象广泛存在于各个不同的器官之间。Pignataro 等^[5]在大脑中动脉缺血 100 min 模型上进行诱导保护研究,发现 3 个循环,每 1 个循环缺血 5 min、再灌注 5 min 可减少 38% 的脑梗死面积。多年来对不同远隔器官进行远程缺血后处理以达到神经保护作用的研究不断取得成功,肢体远程缺血后处理对小鼠大脑缺血再灌注损伤的保护作用也已经得到证实^[6]。肢体远程缺血后处理在无创性、简单性、安全性方面都具有巨大优势。研究表明其机制可能与阿片受体激活、上调内源性一氧化氮合酶有关^[7-8]。AKT/GSK3 β 激活以及线粒体三磷酸腺苷敏感性钾离子通道(KATP)都可能参与了肢体远程缺血后处理的神经保护效应^[9-10]。

药物后处理对局灶性脑缺血损伤的保护作用研究起步较早,其有效性、可控性、简便性在临床应用上已成为共识。DEX 是近年来研发的一种新型高选择性的 α_2 肾上腺素受体激动剂,现已被广泛用于临床麻醉、ICU 镇静等^[11-12]。DEX 后处理对大鼠局灶性脑缺血损伤具有保护作用,能显著改善缺血后脑梗死程度。其机制可能与 DEX 对蓝斑核去甲肾上腺素神经元兴奋性的拮抗而减轻有害刺激和抗炎反应等因素有关^[13-14]。PI3K/Akt 以及 ERK1/2 的激活^[15]都参与了 DEX 脑保护作用的机制。盐酸右美托咪定的分布半衰期约为 6 min,消除半衰期约为 2 h,因此本实验选择在恢复再灌注前 15 min 给药。

本研究结果证实,肢体远程缺血后处理和 DEX 后处理两组在恢复再灌注 24 h 的 Longa 神经行为学评分和 48 h 脑梗死容积百分比与 C 组比较差异有统计学意义(均 $P<0.01$),提示这两种方法都具有明显的神经保护效应。而处理后两组大鼠的神经功能学评分与脑梗死容积百分比差异无统计学意义,提示这两种后处理方式对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用相当。

近年来对联合药物后处理和远程缺血后处理进行器官保护的研究持续成为热点。在药物后处理中,联合多种药物的“鸡尾酒疗法”多年来已广泛应用于缺血性脑损伤的临床保护治疗,并证实了联合治疗的增强效应和良好效果。联合应用多

种处理方式取得增强保护效应可能与其同时作用于多个靶点并启动多个保护机制有关。但目前关于联合应用远程缺血后处理和药物后处理进行脑保护的研究报道仍较少。本研究发现,DEX 后处理和远程缺血后处理都显著改善 24 h Longa 神经功能学评分,但二者联合应用并没有进一步改善神经功能学评分。这可能与本研究样本量和后处理强度不足有关。相信进一步增加样本量和调整处理强度会得出阳性结果。恢复再灌注 48 h 的脑梗死体积百分比提示:DEX 后处理和远程缺血后处理均能显著降低脑梗死体积百分比,二者联合应用能进一步增强保护效应。

综上所述,盐酸右美托咪定后处理和肢体远程缺血后处理都对大鼠局灶性脑缺血损伤产生明显的保护效应。二者保护效果相当,联合应用能更显著地减小脑梗死容积,具有协同保护效应。

参考文献:

- [1] Ren C, Yan Z, Wei D, et al. Limb remote ischemic postconditioning protects against focal ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2009(1288):88-94.
- [2] Sanders RD, Sun P, Patel S, et al. Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection; impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2010, 54(6):710-716.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [4] Paris A, Mantz J, Tonner PH, et al. The effects of dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury are mediated by the alpha2A-adrenoceptor subtype [J]. *Anesth Analg*, 2006, 102(2):456-461.
- [5] Pignataro G, Esposito E, Sirabella R, et al. nNOS and p-ERK involvement in the neuroprotection exerted by remote postconditioning in rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurobiol Dis*, 2013 (54):105-114.
- [6] 赵瑾,李杨,黄磊,等. 肢体缺血后适应对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(6):1096-1101.
- [7] Peng B, Guo QL, He ZJ, et al. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway[J]. *Brain Res*, 2012(1445):92-102.
- [8] Zhou Y, Fathali N, Lekic T, et al. Remote limb ischemic postconditioning protects against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rat pups by the opioid receptor/Akt pathway[J]. *Stroke*, 2011, 42(2):439-444.
- [9] Qi ZF, Luo YM, Liu XR, et al. AKT/GSK3beta-dependent autophagy contributes to the neuroprotection of limb remote ischemic postconditioning in the transient cerebral ischemic rat model[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012 (28):965-973.
- [10] Sun J, Tong L, Luan Q, et al. Protective effect of delayed remote limb ischemic postconditioning; role of mitochondrial K(ATP)channels in a rat model of focal cerebral ischemic reperfusion injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(5):851-859.
- [11] Hong JY, Kim WO, Yoon Y, et al. Effects of intravenous dexmedetomidine on low-dose bupivacaine spinal anaesthesia in elderly patients[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2012, 56(3):382-387.
- [12] Ahmed S, Murugan R. Dexmedetomidine use in the ICU: Are we there yet? [J]. *Crit Care*, 2013, 17(3):320.
- [13] Tanabe K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, et al. Alpha2 adrenoceptor agonist regulates protein kinase C-induced heat shock protein 27 phosphorylation in C6 glioma cells[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(2):519-528.
- [14] Can M, Gul S, Bektas S, Hanci V, et al. Effects of dexmedetomidine or methylprednisolone on inflammatory responses in spinal cord injury [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2009, 53(8):1068-1072.
- [15] Zhu YM, Wang CC, 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.

(收稿日期:2014-03-08 修回日期:2014-07-07)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。