

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.02.003

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20230920.2053.005\(2023-09-21\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20230920.2053.005(2023-09-21))

右美托咪定对脑出血小鼠肥大细胞激活及神经功能损伤的影响*

杨正宇,毛庆祥[△]

(陆军军医大学大坪医院麻醉科,重庆 400042)

[摘要] **目的** 探讨右美托咪定对小鼠脑出血后神经功能损伤及肥大细胞激活的影响。**方法** 小鼠脑出血前 30 min 经腹腔注射右美托咪定,脑出血模型制备完成后检测小鼠神经功能、脑含水量、血肿周围肥大细胞数量及类胰蛋白酶、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达量。**结果** 与对照组比较,脑出血组的小鼠神经功能评分明显提升($P < 0.05$),脑含水量明显增加($P < 0.05$),肥大细胞数量明显增加($P < 0.05$),类胰蛋白酶、IL-1 β 和 TNF- α 表达量明显增加($P < 0.05$);而右美托咪定组的小鼠神经功能评分明显下降($P < 0.05$),脑含水量明显减少($P < 0.05$),肥大细胞数量明显减少($P < 0.05$),类胰蛋白酶、IL-1 β 和 TNF- α 表达量明显减少($P < 0.05$)。**结论** 右美托咪定可以抑制脑出血后血肿周边肥大细胞的激活,减轻小鼠神经功能损害。

[关键词] 右美托咪定;脑出血;肥大细胞;神经功能

[中图法分类号] R743.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)02-0171-05

Effects of dexmedetomidine on activation of mast cells around hematoma and neurological impairment in mouse intracerebral hemorrhage*

YANG Zhengyu, MAO Qingxiang[△]

(Department of Anesthesiology, Daping Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of dexmedetomidine on the neurological function and mast cells activation in the mouse with intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** The mouse was intraperitoneally injected with dexmedetomidine at 30 min before intracerebral hemorrhage. After the preparation of intracerebral hemorrhage model, the neurological function, brain water content, number of mast cells around hematoma and expression levels of tryptase, IL-1 β , TNF- α were detected. **Results** Compared with the control group, the neurological function score in the intracerebral hemorrhage group was significantly elevated ($P < 0.05$), the brain water content was significantly increased ($P < 0.05$), the mast cells number was significantly increased ($P < 0.05$), and the tryptase, IL-1 β and TNF- α expression levels were significantly increased ($P < 0.05$); while the neurological function score in the dexmedetomidine group was significantly decreased ($P < 0.05$), the brain water content was significantly decreased ($P < 0.05$), the number of mast cells was significantly reduced and the tryptase, IL-1 β and TNF- α expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine could inhibit the activation of mast cells around hematoma and reduce the damage of neurological function after mouse intracerebral hemorrhage.

[Key words] dexmedetomidine; intracerebral hemorrhage; mast cell; neurological function

脑出血是一种危及生命的重大疾病,其致残率和病死率都很高^[1-2]。肥大细胞来源于造血干细胞,分布于机体组织、器官、血管周边^[3]。研究发现,脑出血后会诱发脑内肥大细胞激活,并释放类胰蛋白酶、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等物质,从而加重脑出血后脑损伤^[4]。右美托咪定是一种具有镇静、镇痛和抗炎作用的 α 受体激动剂^[5],对神

经系统具有保护作用^[6],但其对脑出血神经功能恢复的作用及机制不明。有研究报道,右美托咪定可抑制心脏肥大细胞脱颗粒从而减轻心肌缺血再灌注损伤^[7],然而右美托咪定能否抑制脑内肥大细胞激活从而改善脑出血后神经功能尚未见文献报道。本研究通过建立小鼠脑出血模型,探讨肥大细胞激活在小鼠脑出血后脑损伤中的作用及右美托咪定对小鼠脑出

血后脑保护作用的相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

27 只雄性昆明鼠(25~30 g)购自重庆医科大学动物中心,小鼠饲养环境:温度 18~28 °C,相对湿度 40%~80%,每天进食正规鼠粮。本实验符合《实验室动物饲养和使用条例》并通过重庆医科大学医学研究伦理委员会审查。将小鼠按随机数字表法分为对照组(Sham 组)、脑出血组(ICH 组)和右美托咪定组(Dex 组),每组 9 只,ICH 组在小鼠脑内注射 30 μ L 自体血,Sham 组不注射自体血,Dex 组在脑出血造模前 30 min 经腹腔注射右美托咪定(扬子江药业集团有限公司,H20183219)50 μ L/kg。

1.2 方法

1.2.1 脑出血模型 根据 LI 等^[8]的方法制备脑出血模型:1%戊巴比妥钠 5 mL/kg 腹腔给药麻醉小鼠,并将小鼠置于神经定位仪(深圳市瑞沃德有限公司),以小鼠前囟为坐标,首先向前移动 0.5 mm,然后向右移动 2.3 mm,最后垂直向下移动 3.7 mm。用肝素液润滑过的微量注射器(上海市高鸽工贸公司)采集小鼠尾部自体血 30 μ L 注射,注射完毕后使微量注射器停留于靶注射点,10 min 后缓慢退出微量注射器,以此来模拟脑出血,最后进行彻底消毒,缝合切口。造模成功后 24 h 进行神经功能检测,随即进行脑含水量检测、HE 染色、免疫荧光染色和 Western blot 实验。

1.2.2 神经行为学评分

根据 LIU 等^[9]评分指标,采用 mNSS 测试检测小鼠神经功能,mNSS 测试分为运动实验、感觉实验、平衡木实验及反射丧失和不正常运动实验,4 项实验的评分总和为 mNSS 测试评分,mNSS 测试最低评分 0 分,最高评分 18 分,评分越高说明神经功能损伤越严重。实验采用双盲法。

1.2.3 苏木精-伊红染色

小鼠麻醉后经心尖灌注 4 °C 0.9%氯化钠(30 mL/只),并用 4%多聚甲醛固定(30 mL/只),然后将脑组织置于蔗糖溶液中脱水,最后将脑组织包埋,放置于冰冻切片机中,20 min 速冻,切取厚度为 10 μ m 的脑冠状切片,HE 染色液(上海 Sangon Biotech 有限公司)染色脑组织切片 5 min,然后用清水冲洗切片,0.1%盐酸乙醇分色 15 s,最后将组织切片放入 95%乙醇脱水并用二甲苯澄清,装片。每组各取小鼠 3 只,共 9 只,在小鼠脑出血后 24 h 进行。

1.2.4 脑含水量测定

小鼠断头取脑,分别测量脑组织的湿重和干重,并计算脑含水量,计算公式为:(湿重-干重)/湿重 \times 100%。每组各取小鼠 3 只,共 9 只,在小鼠脑出血后 24 h 进行。

1.2.5 免疫荧光染色

将 30 μ L 封闭液滴加到组织切片上,经过 1 h 封闭,晾干后滴加 20 μ L(1:100)小鼠抗小鼠类胰蛋白酶单克隆抗体(1:1 000,美国 Novus Biologicals 公司),并

将其置于 4 °C 冰箱孵育过夜。次日,用 0.01% PBST 漂洗组织切片 15 min,重复 3 次,晾干后滴加 20 μ L 美国 Abbkine 公司 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:100),置于 37 °C 温箱中孵育 1 h,以确保完全结合,然后用 0.01% PBST 漂洗 15 min 并重复 3 次,晾干后滴加 DAPI(上海碧云天生物技术公司)溶液 20 μ L,最后封片并将切片置于荧光显微镜下计算肥大细胞数量。每组小鼠 3 只,共 9 只,在小鼠脑出血后 24 h 进行。

1.2.6 Western blot

将小鼠麻醉后暴露心脏,然后经心尖灌注生理盐水 30~40 mL,取出小鼠大脑,分离出血侧脑组织称重,每 1 g 脑组织中加入 8 mL 的组织裂解液,并将其充分研磨后,静置 15 min,然后置于 4 °C 离心机,12 000 r/min 离心 20 min,提取上清液,与 5 \times loading buffer 以 4:1 的配比混匀,最后在 95 °C 的温度下煮 5 min。将上样蛋白样品通过 SDS-PAGE 电泳和电转(250 mA,30~50 min)转移到 PVDF 膜上,在 37 °C 摇床封闭 2 h 后,将小鼠抗小鼠类胰蛋白酶单克隆抗体、兔抗小鼠 IL-1 β 和 TNF- α 单克隆抗体(1:700,美国 Affinity 公司)和大鼠抗小鼠 β -actin 多克隆抗体(1:5 000,美国 Santa Cruz 公司)滴加到 PVDF 膜上,并放入 4 °C 冰箱孵育过夜。次日,用 0.01% PBST 清洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min,然后将 PVDF 膜放入稀释比为 1:5 000 的二抗液中孵育 1 h,再次清洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min。最后将 ECL 发光液 100 μ L 滴加到 PVDF 膜,静置 30 s 后,置于凝胶成像仪(广州光仪科技公司)中检测蛋白表达量。每组各取小鼠 3 只,共 9 只,在小鼠脑出血后 24 h 进行。

1.3 统计学处理

使用 Graph Pad Prism 7.0 数据分析程序进行 One-Way ANOVA 分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右美托咪定减轻小鼠脑出血后神经运动功能障碍

mNSS 测试结果显示,ICH 组小鼠神经运动功能评分较 Sham 组明显提高($P < 0.05$),而 Dex 组神经运动功能评分较 ICH 组有所下降($P < 0.05$),较 Sham 组神经运动功能评分提高($P < 0.05$),见图 1。

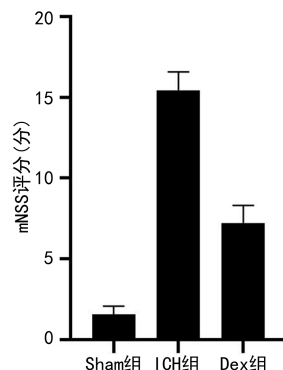


图 1 各组小鼠神经运动功能损伤程度

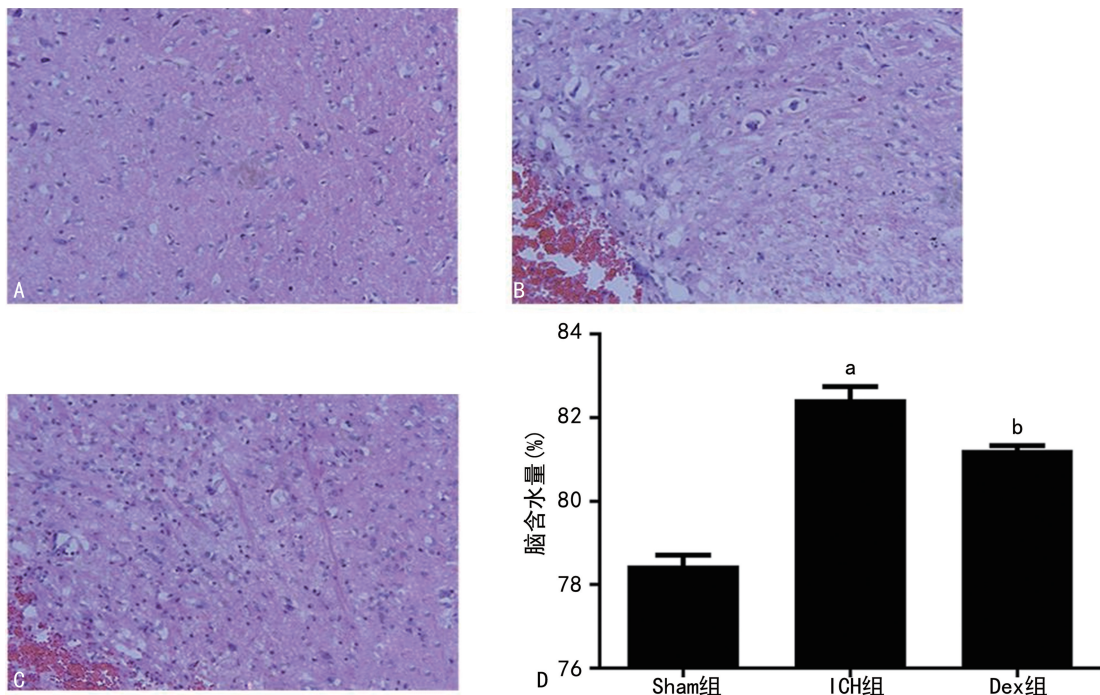
2.2 右美托咪定减轻小鼠脑出血后脑水肿

HE 染色结果显示,与 Sham 组相比,ICH 组血肿周围脑组织肿胀明显,表现为空泡样自溶坏死,而 Dex 组一定程度逆转了这一现象。脑含水量检测结果显示,ICH 组右侧大脑含水量明显高于 Sham 组 ($P < 0.05$),而 Dex 组右侧大脑含水量明显低于 ICH

组 ($P < 0.05$),见图 2。

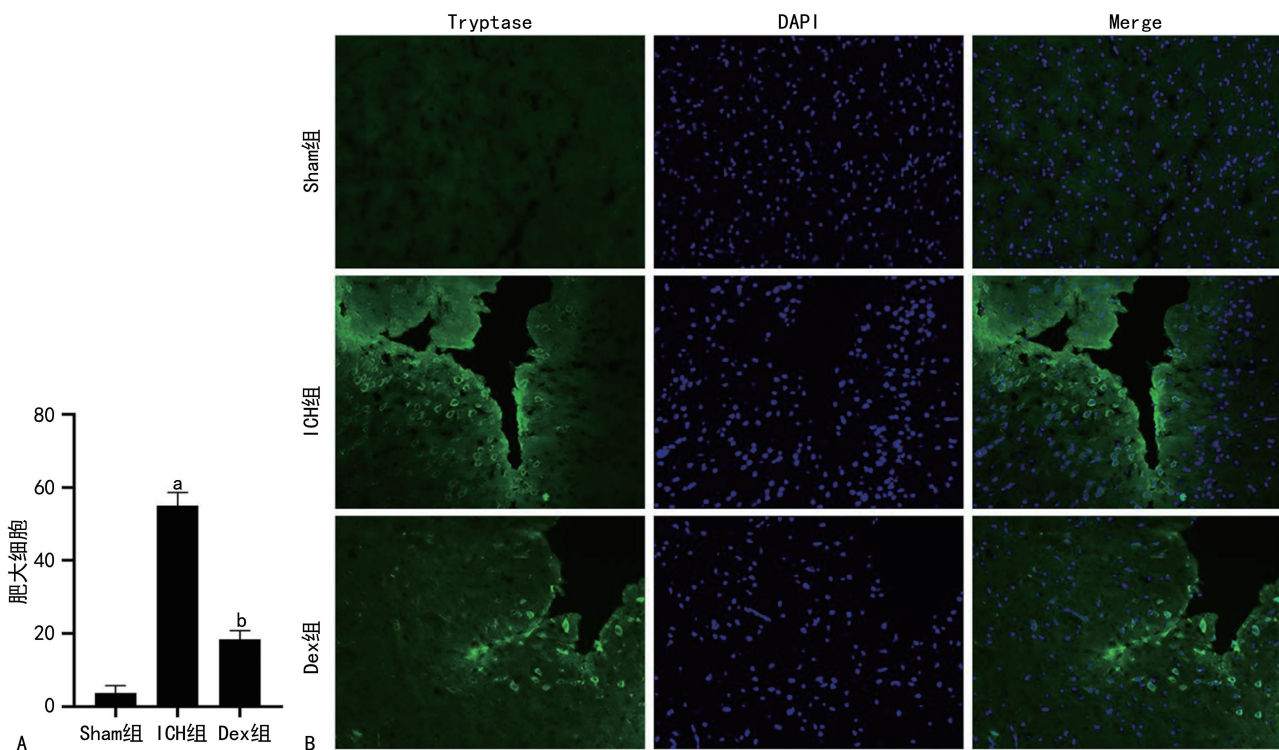
2.3 右美托咪定减少小鼠脑出血后肥大细胞数量

免疫荧光结果显示,ICH 组血肿周围肥大细胞数量较 Sham 组增多 ($P < 0.05$),而 Dex 组肥大细胞数量较 ICH 组减少 ($P < 0.05$),见图 3。



A: Sham 组 HE 染色图, Bar=50 μm ; B: ICH 组 HE 染色图, Bar=50 μm ; C: Dex 组 HE 染色图, Bar=50 μm ; D: 脑含水量检测结果。^a: $P < 0.05$,与 Sham 组比较;^b: $P < 0.05$,与 ICH 组比较。

图 2 各组小鼠脑水肿检测



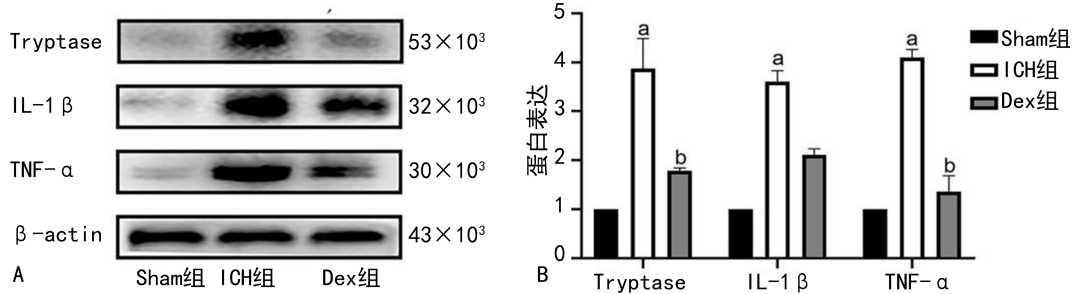
A: 肥大细胞数量统计图; B: 免疫荧光染色图, Bar=50 μm 。^a: $P < 0.05$,与 Sham 组比较;^b: $P < 0.05$,与 ICH 组比较。

图 3 肥大细胞免疫荧光染色图

2.4 右美托咪定降低小鼠脑出血后脑内类胰蛋白酶、IL-1 β 和 TNF- α 表达

Western blot 结果显示, ICH 组小鼠脑内类胰蛋

白酶、IL-1 β 和 TNF- α 表达较 Sham 组明显增加($P < 0.05$), 而 Dex 组小鼠脑内类胰蛋白酶、IL-1 β 和 TNF- α 表达较 ICH 组明显减少($P < 0.05$), 见图 4。



A: 蛋白条带图; B: 蛋白表达量统计图。^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ICH 组比较。

图 4 Western blot 检测各组小鼠脑内类胰蛋白酶、IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平

3 讨 论

脑出血后会引发神经功能损伤, 血肿对脑组织的压迫会导致原发性脑损伤, 而脑出血后血肿周围的一系列病理生理反应会导致继发性脑损伤^[10-12]。然而, 有关脑出血后继发性脑损伤的机制尚不完全清楚, 缺乏有效的防治措施。有研究发现, 脑出血会诱发脑内肥大细胞激活并发生脱颗粒从而加重脑出血后炎症反应, 进而加重脑出血后继发性脑损伤^[13]。本研究结果显示, 小鼠脑出血后脑组织内类胰蛋白酶、IL-1 β 和 TNF- α 表达量增加, 并且血肿周围肥大细胞数量增多, 这表明脑出血后肥大细胞激活, 从而引发肥大细胞脱颗粒, 这与之前的研究结果相符。

右美托咪定对脑出血后脑损伤有保护作用, 有研究指出, 右美托咪定通过抑制神经元自噬作用、凋亡和炎症反应而起到神经保护作用^[14-18]。临床研究表明, 右美托咪定对高血压脑出血患者具有一定的脑保护作用, 并且对患者的呼吸和循环影响较小, 是高血压脑出血患者围术期镇静镇痛治疗的安全有效药^[19-20]。另有研究报道, 右美托咪定可以有效抑制肥大细胞激活, 从而减轻脊髓缺血再灌注损伤。此外, 研究还发现, 右美托咪定通过抑制肥大细胞激活来减轻丁哌卡因诱发的坐骨神经炎症反应^[21-22]。在本研究中, Western blot 实验表明: 右美托咪定可以降低小鼠脑出血后类胰蛋白酶、IL-1 β 和 TNF- α 的表达; 免疫荧光实验和甲苯胺蓝染色实验结果显示: 右美托咪定明显减少了小鼠脑出血后血肿周围肥大细胞数量, 从而减轻了小鼠脑出血后脑水肿和神经功能损伤。因此, 笔者推测右美托咪定可通过抑制肥大细胞激活而减轻小鼠脑出血后脑损伤。然而, 右美托咪定抑制肥大细胞激活的具体机制需要更深一步探究, 有研究报道, 右美托咪定通过抑制内质网应激反应而减轻小鼠脑损伤^[23], 在后续的研究中本课题组将探索右美托咪定是否通过抑制内质网应激反应而减轻肥大细胞

脱颗粒, 从而减轻脑出血后脑损伤。

综上所述, 小鼠脑出血后, 脑内肥大细胞激活并加重神经功能损伤。右美托咪定可能通过抑制肥大细胞激活而改善神经功能损伤。本实验是在小鼠脑出血前给予右美托咪定, 而对于脑出血后给予右美托咪定能否减轻脑出血后脑损伤值得研究, 本实验对右美托咪定的脑保护作用提出了新的观点。

参考文献

- [1] CHEN S, PENG J, PRATIVA S, et al. TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice[J]. Neuroinflammation, 2020, 17(1): 168.
- [2] BAO W, ZHOU X, ZHOU L, et al. Targeting miR-124/Ferroportin signaling ameliorated neuronal cell death through inhibiting apoptosis and ferroptosis in aged intracerebral hemorrhage murine model[J]. Aging Cell, 2020, 19(11): e13235.
- [3] DAHLIN J, HALLGREN J. Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues[J]. Mol Immunol, 2015, 63(1): 9-17.
- [4] YANG Z, LU W, LIAO Y, et al. ER stress is involved in mast cells degranulation via IRE1 α /miR-125/Lyn pathway in an experimental intracerebral hemorrhage mouse model[J]. Neurochem Res, 2022, 47(6): 1598-1609.
- [5] TASBIHGOU S, BARENDIS C, ABSALOM C. The role of dexmedetomidine in neurosurgery[J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2021, 35(2): 221-229.
- [6] SHAO G. Dexmedetomidine inhibits cerebral nerve

- cell apoptosis after cerebral hemorrhage in rats via the Nrf2/HO-1/NQO1 signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(13): 4574-4582.
- [7] XIONG W, ZHOU R, QU Y, et al. Dexmedetomidine preconditioning mitigates myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibition of mast cell degranulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111853.
- [8] LI Z, LI M, SHI S, et al. Brain transforms natural killer cells that exacerbate brain edema after intracerebral hemorrhage [J]. *Exp Med*, 2020, 217(12): e20200213.
- [9] LIU T, CUI Y, DONG S, et al. Treadmill training reduces cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis through activation of SLC7A11/GPX4 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8693664.
- [10] ZHU Y, HUANG Y, YANG J, et al. Intranasal insulin ameliorates neurological impairment after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(1): 210-216.
- [11] LI Z, KHAN S, LIU Y, et al. Therapeutic strategies for intracerebral hemorrhage [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 1032343.
- [12] ZHENG Y, LI R, FAN X. Targeting oxidative stress in intracerebral hemorrhage: prospects of the natural products approach [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(9): 1811.
- [13] MANAENKO A, LEKIC T, MA Q, et al. Hydrogen inhalation ameliorated mast cell-mediated brain injury after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(5): 1266-1275.
- [14] HUANG J, JIANG Q. Dexmedetomidine protects against neurological dysfunction in a mouse intracerebral hemorrhage model by inhibiting mitochondrial dysfunction-derived oxidative stress [J]. *Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(5): 1281-1289.
- [15] LIU M, ZHAO X, GONG H, et al. Dexmedetomidine prevents hemorrhagic brain injury by reducing damage induced by ferroptosis in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 788: 136842.
- [16] MEI B, LI J, ZUO Z. Dexmedetomidine attenuates sepsis-associated inflammation and encephalopathy via central $\alpha 2A$ adrenoceptor [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91: 296-314.
- [17] UNCHITI K, LEURCHARUSMEE P, SAME-RCHUA A, et al. The potential role of dexmedetomidine on neuroprotection and its possible mechanisms: evidence from in vitro and in vivo studies [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 54(9): 7006-7047.
- [18] MENG F, YU W, DUAN W, et al. Dexmedetomidine attenuates LPS-mediated BV2 microglia cells inflammation via inhibition of glycolysis [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2020, 34(3): 313-320.
- [19] GONG W, ZHANG S, LI X, et al. Dexmedetomidine is superior to midazolam for sedation and cerebral protection in postoperative hypertensive intracerebral hemorrhage patients: a retrospective study [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(9): 300060520957554.
- [20] GUO Q, MA M, YANG Q, et al. Effects of different sedatives/analgesics on stress responses in patients undergoing craniotomy and bone flap decompression [J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(12): 3000605211062789.
- [21] MA J, ZHANG X, WANG C, et al. Dexmedetomidine alleviates the spinal cord ischemia-reperfusion injury through blocking mast cell degranulation [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 14741-14749.
- [22] TUFEK A, KAYA S, TOKGOZ O, et al. The protective effect of dexmedetomidine on bupivacaine-induced sciatic nerve inflammation is mediated by mast cells [J]. *Clin Invest Med*, 2013, 36(2): E95-102.
- [23] SUN D, WANG J, LIU X, et al. Dexmedetomidine attenuates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improves neuronal function after traumatic brain injury in mice [J]. *Brain Res*, 2020, 1732: 146682.

(收稿日期: 2023-07-18 修回日期: 2023-09-22)

(编辑: 石芸)