

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.04.001
文章编号: 1005-8982(2016)04-0001-04

论著

右美托咪定预处理抑制脑缺血再灌注时谷氨酸的释放及其受体机制研究*

尚宇¹, 关双成¹, 李悦², 高光洁¹

(1.解放军第四六三医院 麻醉科, 辽宁 沈阳 110042; 2.哈尔滨医科大学
附属一院 麻醉科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的 评价右美托咪定预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤时海马谷氨酸(Glu)及其受体 NMDAR1(NR1)表达的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体重 250-300 g, 采用随机数字表法, 将其分为 3 组($n=30$): 假手术组(S 组)、全脑缺血再灌注组(I/R 组)和右美托咪定组(D 组), 采用四血管阻断法制备全脑缺血再灌注损伤模型。D 组于全脑缺血前 2 h 经尾静脉注射右美托咪定 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$, 随后以 $3 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 速率输注 120 min, I/R 组给予等容量生理盐水。应用 Combs 评分系统评价大鼠神经运动功能的缺损情况; 采用脑微透析技术结合高效液相色谱(HPLC)检测大鼠海马细胞外 Glu 水平的变化; 采用免疫组织化学方法检测海马 CA1 区 NR1 蛋白表达。**结果** 与 S 组比较, I/R 组和 D 组大鼠平衡木和引绳肌力试验评分下降($P<0.05$), 海马细胞外 Glu 的水平增高($P<0.05$), 海马 CA1 区 NR1 表达上调($P<0.05$); 与 I/R 组比较, D 组大鼠平衡木和引绳肌力试验评分升高($P<0.05$), 海马细胞外 Glu 的水平降低($P<0.05$), 海马 CA1 区 NR1 表达下调($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定可减轻大鼠全脑缺血再灌注损伤, 改善神经运动功能的缺损, 其机制与抑制 Glu 释放和下调 NR1 表达有关。

关键词: 右美托咪定; 缺血 / 再灌注损伤; 谷氨酸; N-甲基-D-天冬氨酸受体

中图分类号: R363; R-332

文献标识码: A

Dexmedetomidine inhibit Glu release and NR1 expression in hippocampus on global cerebral ischemia-reperfusion rats*

Yu Shang¹, Shuang-cheng Guan¹, Yue Li², Guang-jie Gao¹

(1.Department of Anesthesiology, PLA 463rd Hospital, Shenyang, Liaoning 110042, China;

2.Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Harbin
Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Dexmedetomidine on glutamate (Glu) release and NR1 expression in hippocampus on global cerebral ischemia-reperfusion rats. **Methods** Ninety male Wistar rats were randomly divided into three groups; group S received sham operation; group I/R received ischemia-reperfusion; group D received Dexmedetomidine treatment before ischemia-reperfusion ($n=30$). Global cerebral ischemia was induced according to Pulsinelli-Brierley method. In group D, Dexmedetomidine $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ was injected through tail vein before ischemia, then $3 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ with injection pump. Meanwhile equal volume saline administrated in group I/R animals. Combs was used to evaluate nerve function of rats; Glu levels were detected by HPLC in the rat hippocampus; NR1 expression in CA1 area was detected by immunohistochemistry method. **Results** Compared with group S, Balance beam and rope strength test scores in group I/R and D were significant decrease ($P<0.05$), and the level of Glu and NR1 were increase significantly ($P<0.05$). Compared with group I/R, Balance beam and rope strength test scores in group D were significant decreased ($P<0.05$), and the level of Glu and NR1 were increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine can reduce the rat global cerebral ischemia reperfusion injury and improve the nerve

收稿日期: 2015-09-16

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (No: 2015020416)

[通信作者] 高光洁, E-mail: guangjie420@126.com, Tel: 024-28845351

function defect, and the mechanism is related to the inhibition of Glu release and down regulate NR1 expression.

Keywords: Dexmedetomidine; ischemia/reperfusion injury; glutamate; N-methyl-D-aspartate receptor

神经外科、心脏及大血管围手术期均有潜在脑缺血的危险,因此,术中如何最大程度预防和减轻脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)后的神经功能损伤备受关注。右美托咪定(dexmedetomidine, DEX)是一种新型的高选择性肾上腺素 α_2 受体激动药,作为一种麻醉辅助用药已经在临床上广泛应用。近年来,有动物实验研究^[1]发现右美托咪定能够减轻实验动物短暂性的整体或局部脑缺血后神经损伤,表明其具有神经保护功能,但机制尚不明确,推测其可能与降低儿茶酚胺水平、减少兴奋性神经递质释放等有关。因此,本实验在建立大鼠全脑缺血再灌注损伤模型基础上,通过观察模型大鼠功能行为学变化和谷氨酸(glutamate, Glu)及其受体 NMDAR1(N-methyl-D-aspartate receptor, NR1)的演变规律,明确其对脑 I/R 损伤的保护机制,为预防和减轻围术期脑缺血损伤提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

CK-2 倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司, Metamorph 显微图像分析系统购自美国 Universal-Corp 公司, Cryotome E 冷冻切片机购自英国 SHAN DON 公司,江湾 I 型 C 大鼠脑立体定位仪购自第一军医大学, LC-10AD 液相恒流泵和 L-ECD-6A 电化学检测器购自日本 Shimadzu 公司,谷氨酸标准品购自 SIGMA 化学公司,右美托咪定购自江苏恒瑞医药股份有限公司, NMDAR1 免疫组织化学染色试剂盒和兔抗 NMDAR1 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物分组与给药

健康雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体重 250 ~ 300 g, 购自沈阳军区总医院实验动物中心(合格证号: SYXK(军)2012-0001)。随机分成 3 组, 每组 30 只。①假手术组(S 组); ②全脑缺血再灌注组(I/R 组); ③右美托咪定组(D 组)。D 组于全脑缺血前 2 h 经尾静脉注射(注射时间 10 min)右美托咪定 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$, 随后以 $3 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 速率输注 120 min; I/R 组给予等容量生理盐水。

1.3 大鼠脑内微透析模型的建立

随机抽取 10 只 Wistar 大鼠麻醉后, 颅平位固定于大鼠脑立体定位仪上。参照 Paxinos & Watson 大

鼠脑图谱, 将自制透析管横向植入双侧海马(AP: +4.2 mm, V: -3.5 mm)用牙科水泥固定, 待透析灌流实验。将大鼠脑内透析管与微量透析泵相连, 用灌流液(Ringer's: 氯化钠 NaCl 147 mmol/L, 氯化钾 KCl 4.0 mmol/L, 氯化钙 CaCl_2 2.3 mmol/L)以 $2 \mu\text{l}/\text{min}$ 流速恒定灌流, 于不同时点收集一个样品, 立即注入荧光检测器测定含量。灌流结束后用组织学方法检查透析管埋植的位置, 取透析管在海马的样本列入统计数据。

1.4 大鼠脑缺血/再灌注模型的建立

透析模型制备完毕后, 将大鼠置于鼠板腹位固定, 参照 Pulsinelli 的方法^[2], 大鼠颈部背侧切口, 暴露第一颈椎两侧翼小孔, 热凝闭双侧椎动脉, 造成永久性闭塞, 缝合皮肤切口, 放回保温鼠笼。手术 24 h 后, 乙醚麻醉固定大鼠, 颈前切口游离双侧颈总动脉, 穿线提出颈总动脉, 待其清醒后, 用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉造成全脑缺血, 缝合颈部伤口, 同时双侧颞部头皮插入电极描记脑电波判断模型是否成功。缺血 15 min 后, 松开动脉夹恢复脑血流再灌注 6 h。整个实验过程, 用电灯泡保持大鼠直肠温度在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

1.5 谷氨酸测定

流动相: 溶剂 A 为 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH=6.8)-甲醇-四氢呋喃(800:192:8, V/V); 溶剂 B 为 0.05 mol/L 柠檬酸三钠缓冲液(pH=6.8)-甲醇(2:8), 用 G6 垂熔漏斗过滤; 流速: 1.0 ml/min; 荧光检测器工作波长: 350 nm(激发波长)和 450 nm(检测波长)。精确吸取透析液 $20 \mu\text{l}$, 直接注入 HPLC-RF-10AXL 荧光检测系统中对 Glu 含量进行检测。

1.6 免疫组织化学方法检测 NR1 的蛋白表达

各组随机抽取 10 只大鼠于再灌注 3 h 后, 用含 4%多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液经心脏升主动脉灌流固定, 断头置于冰盒玻璃板上取出全脑, 放入同样固定液中进行后固定 8 h(4°C)再将组织移入含 20%~30%的蔗糖磷酸缓冲液中(pH=7.4)浸至其沉底。次日用 Cryotome E 冷冻切片机在 -24°C 下工作, 切片厚度为 $8 \mu\text{m}$ 。对大鼠脑组织连续冠状切片, 同时用苏木素速染, 显微镜下观察, 取每只大鼠脑前囟后 3 ~ 3.5 mm 范围为实验部位。至所需部位后, 切片、留片。每隔 3 取 1, 连续留 5 张切片, APES 贴片,

切片分3套,分别进行NR1免疫组织化学染色,NR1免疫组织化学对照实验及HE染色。切片后依次加入3%过氧化氢甲醇溶液室温30 min;正常山羊血清37℃30 min;兔抗NR1多克隆抗体置湿盒4℃过夜;生物素标记的二抗37℃30 min;链酶亲和素过氧化物酶37℃30 min;然后滴加新鲜配制的DAB显色液镜下观察5~20 min,蒸馏水冲洗,脱水,透明,中性树胶封片,光镜下观察。Metamorph显微图像分析仪对切片进行图像分析测量海马CA1区:①积分光密度;②阳性细胞面积;③灰度值,每只大鼠测5张切片,取平均值。

1.7 大鼠脑缺血损伤神经功能缺损的行为学评分

参照Combs的方法^[3],各组随机抽取10只大鼠于再灌注24 h后进行双盲运动功能评价(平衡木试验和引绳肌力试验)。由两位观察者进行打分,记录平均分数。每项测试间隔2~3 min,以避免疲劳影响。行为测定在安静的环境中进行。平衡木试验评分标准:0分:不能平衡,1分:维持10 s,2分:维持11~

20 s,3分:维持21~30 s;引绳肌力试验评分标准:0分:坚持0~2 s,1分:坚持3~4 s,2分:坚持5 s第三肢不能搭上,3分:坚持5 s可将第三肢搭上。

1.8 统计学方法

采用SPSS 14.0统计软件进行统计学处理,实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较先经方差齐性检验,方差齐性数据采用单因素方差分析;非齐性数据采用t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马细胞外Glu水平变化

大鼠脑缺血15 min再灌注0~1 h时海马细胞外Glu含量开始增多,再灌注3 h达高峰,6 h后逐渐降低。与S组相应时间点比较,I/R组和D组大鼠海马细胞外Glu的水平增高($P < 0.05$);D组在相应时间点与I/R组比较,海马细胞外Glu的水平降低($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠海马细胞外Glu水平变化 ($n=10, \mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	脑缺血前	脑缺血15 min	再灌注		
			1 h	3 h	6 h
S组	5.27 ± 0.50	5.28 ± 0.51	5.29 ± 0.52	5.27 ± 0.51	5.29 ± 0.58
I/R组	5.26 ± 0.47	13.51 ± 2.27 ¹⁾	18.34 ± 3.04 ¹⁾	25.47 ± 4.11 ¹⁾	19.78 ± 3.89 ¹⁾
D组	5.28 ± 0.50	9.27 ± 1.71 ¹⁾²⁾	11.21 ± 2.08 ¹⁾²⁾	15.34 ± 2.53 ¹⁾²⁾	12.42 ± 2.26 ¹⁾²⁾

注:1)与S组比较, $P < 0.05$;2)与I/R组比较, $P < 0.05$

2.2 各组大鼠海马CA1区NR1表达变化

与S组比较,I/R组和D组大鼠海马CA1区NR1积分光密度、阳性细胞面积、平均灰度值均差异有统计学意义($P < 0.05$);与I/R组比较,D组大鼠海马CA1区NR1蛋白的表达下调($P < 0.05$)。积分光密度越强、阳性细胞面积越大、平均灰度值越小,表示阳性产物NR1表达越强烈。见表2。

2.3 各组大鼠神经功能缺损的行为学评分结果

与S组比较,I/R组和D组大鼠平衡木和引绳肌力试验评分下降($P < 0.05$);与I/R组比较,D组大鼠平衡木和引绳肌力试验评分升高($P < 0.05$)。见表3。

表2 脑缺血再灌注3h各组大鼠海马CA1区NR1表达变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	积分光密度	阳性细胞面积	灰度值
S组	4 078.4 ± 364.1	52 646.4 ± 3 371.1	220.4 ± 17.8
I/R组	12 847.3 ± 986.7 ¹⁾	94 151.3 ± 7 432.8 ¹⁾	85.3 ± 8.6 ¹⁾
D组	7 032.5 ± 408.2 ¹⁾²⁾	67 147.8 ± 4 436.1 ¹⁾²⁾	143.2 ± 12.4 ¹⁾²⁾

注:1)与S组比较, $P < 0.05$;2)与I/R组比较, $P < 0.05$

表3 各组大鼠神经功能行为学评分 ($n=10, \text{分}, \bar{x} \pm s$)

组别	平衡木试验	引绳肌力试验
S组	3.42 ± 0.63	3.18 ± 0.57
I/R组	0.93 ± 0.72 ¹⁾	0.78 ± 0.63 ¹⁾
D组	2.05 ± 0.51 ¹⁾²⁾	1.79 ± 0.48 ¹⁾²⁾

注:1)与S组比较, $P < 0.05$;2)与I/R组比较, $P < 0.05$

3 讨论

脑缺血损伤涉及多种病理过程,兴奋性毒性是主要机制之一,其中谷氨酸(Glu)及其受体的病理变化是引起兴奋性毒性的重要病理基础。在中枢神经系统缺血缺氧等病理条件下,内源性Glu过度释放或摄取障碍,使细胞外Glu浓度急剧升高,细胞间隙堆砌的Glu使谷氨酸受体过度激活,引起钙超载、一氧化氮NO生成增多等一系列毒性反应,产生兴奋性毒性^[4]。

N-甲基-D-天冬氨酸受体是一种离子型谷氨酸受体,其中NR1亚单位是NMDAR的功能单位,

具有 NMDAR 的一切药理学和电生理学特性, NR1 基因紊乱直接影响 NMDAR 的生物活性及功能状态。脑缺血损伤后诱导或加强 NR1 的表达, 上调的 NR1 可介导钙离子 Ca^{2+} 通道开放, 使大量 Ca^{2+} 内流, 引起一系列 Ca 依赖的过度生化反应^[9]。因此, 检测 NR1 的蛋白表达, 能从分子水平上评估药物对脑缺血再灌注损伤的保护机制及疗效。

全脑缺血可导致不同程度的神经功能缺损, 运动功能是检测大鼠神经功能的重要指标。Combs 评分系统通过特定的运动功能评分标准对大鼠进行客观评价神经功能缺损情况^[6]。本研究采用 Combs 评分法观察到 D 组大鼠运动功能评分虽低于 S 组, 但却明显高于 I/R 组, 提示右美托咪定预处理对运动功能有一定程度的改善, 有助于缓解脑缺血再灌注大鼠的神经损伤。

“四血管闭塞法”全脑缺血模型大鼠能较好地模拟围手术期因严重低血压、休克甚至心肺复苏等造成的全脑缺血性损伤过程。本研究在评估大鼠神经功能行为学的基础上, 采用脑微透析技术结合免疫组织化学法动态观察活体脑缺血再灌注大鼠模型海马 Glu 含量及其受体的变化, 发现大鼠海马 Glu 水平与海马 CA1 区 NR1 表达变化趋势相一致: 即大鼠海马区 Glu 释放和 NR1 的蛋白表达均在再灌注 0~1 h 开始增多, 3 h 达到高峰, 然后逐渐下降, 本文选缺血再灌注 3 h 作为观察右美托咪定脑保护作用时间点。研究结果表明, 与 I/R 组比较, D 组大鼠海马 Glu 含量降低, NR1 的表达下调, 提示右美托咪定能对抗脑缺血再灌注后 Glu 过度释放及 NR1 的表达, 减轻 Glu 过量生成和 NR1 的高表达而导致的脑继发性损害, 其机制可能是通过以下途径实现: ①在脑缺血、缺氧的情况下, 右美托咪定能通过激活 G0 蛋白偶联的 $\alpha 2\text{-AR}$, 抑制 N 型电压门控性钙离子通道等因素抑制 Glu 的释放^[7]; ②右美托咪定通过抑制儿茶酚胺释放, 调节脑氧供需平衡, 降低神经元对兴奋性氨基酸 -Glu 的敏感性, 减轻 Glu 的兴奋性毒性效应或提高缺血区域灌注产生神经保护作用^[8]; ③右美托咪定作用于星形胶质细胞上的 $\alpha 2\text{-AR}$ 促进星形胶质细胞对 Glu 的摄取及其氧化降解, Glu 释放减少抑制了肾上腺素 β 受体的活性, 降低神经元的代谢率^[9]。Chen 等^[10]也发现, 在体外培养的星形胶质细胞加入右美托咪定后细胞内二氧化碳 CO_2 生成增加, 氧化代谢增强, 星形胶质细胞对细胞间隙

Glu 的清除能力增加, 细胞外 Glu 含量减少, Glu 激活星形胶质细胞膜上 NR1 减少, 星形胶质细胞激活减少; 本次研究的前期工作也发现^[11]右美托咪定预处理后通过抑制大鼠齿状回星形胶质细胞 GFAP 的高表达, 减缓脑缺血时星形胶质细胞的过度活化, 稳定内环境, 维持缺血时星形胶质细胞的增生状态, 有利于缺血后损伤脑组织的修复, 从而减轻神经功能的损害。

综上所述, 右美托咪定可减轻大鼠全脑缺血再灌注损伤, 改善神经运动功能的缺损, 其机制可能与抑制 Glu 释放和下调 NR1 的表达有关。

参 考 文 献:

- [1] Kose EA, Bakar B, Kasimcan O, et al. Effects of intracisternal and intravenous dexmedetomidine on ischemia-induced brain injury in rat: comparative study[J]. Turk Neurosurg, 2013, 23(2): 208-217.
- [2] Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia[J]. Ann Neurol, 1982, 11(5): 491-498.
- [3] Combs D, D'Alecy L. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1, 3-butanediol[J]. Stroke, 1987, 18(2): 503-511.
- [4] 宋文婷, 徐立, 刘建勋. 脑缺血后谷氨酸及其受体介导的神经细胞损伤及相关药物研究进展[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 747-750.
- [5] Knox R, Zhao C, Miguel-Perez D, et al. Enhanced NMDA receptor tyrosine phosphorylation and increased brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in mice with neuronal Fyn overexpression [J]. Neurobiol Dis, 2013, 51(3): 113-119.
- [6] 刘小蒙, 王荣亮, 罗玉敏. 大鼠脑缺血神经功能缺损行为学评价的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2012, 9(4): 208-212.
- [7] Chui KM, Lin TY, Lu CW, et al. Inhibitory effect of glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals by $\alpha 2$ adrenoceptor agonist dexmedetomidine[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 670(1): 137-147.
- [8] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, et al. Characterization of the post-conditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation[J]. Anesthesiology, 2010, 112(2): 373-383.
- [9] 焦薇, 周脉涛, 吴文华, 等. 右美托咪定与咪唑安定对重型颅脑外伤患者围术期炎症反应及颅内压的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(17): 34-38.
- [10] Chen Y, Zhao Z, Code WE, et al. A correlation between dexmedetomidine-induced biphasic increases in free cytosolic calcium concentration and energy metabolism in astrocytes [J]. Anesth Analg, 2000, 91(2): 353-357.
- [11] 尚宇, 顾佩菲, 袁士涛, 等. 右美托咪定预处理对局灶性脑缺血/再灌注星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(7): 799-803.

(张蕾 编辑)