

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.06.001  
文章编号: 1005-8982(2019)06-0001-05

基础研究·论著

## 右美托咪定对体外循环大鼠脑损伤的影响\*

陈燕桦, 张炳东, 何芳, 周丽芳, 韦祎, 谢玉波

(广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530021)

**摘要: 目的** 观察右美托咪定对大鼠体外循环相关脑损伤的影响。**方法** 将48只健康雄性SD大鼠随机分为假手术组(S组)、体外循环组(CPB组)和右美托咪定组(Dex组), 每组16只。S组不进行体外循环转流; CPB组行体外循环转流120 min; Dex组泵注右美托咪定, 并行体外循环转流120 min。采用ELISA法检测不同时点血浆IL-6因子的表达, TUNEL检测海马CA1区神经细胞凋亡, Western blotting检测大鼠海马组织cleaved Caspase-3蛋白的表达, 称重法检测大鼠组织含水量。**结果** 与体外循环前( $T_0$ )比较, 体外循环1 h( $T_1$ )、体外循环2 h( $T_2$ )时CPB组、Dex组大鼠血浆IL-6浓度升高( $P < 0.05$ ); 与S组比较, CPB组体外循环后大鼠海马CA1区凋亡阳性细胞和脑组织含水量增多( $P < 0.05$ ), 大鼠血浆IL-6因子和海马组织cleaved Caspase-3蛋白表达升高( $P < 0.05$ ); 与CPB组比较, Dex组体外循环后大鼠海马CA1区凋亡阳性细胞和脑组织含水量减少( $P < 0.05$ ), 大鼠血浆IL-6因子和海马组织cleaved Caspase-3蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。**结论** 右美托咪定可以减轻体外循环大鼠脑损伤, 其机制可能与抑制体外循环相关的炎症反应、下调cleaved Caspase-3蛋白表达有关。

**关键词:** 脑损伤; 体外循环; 右美托咪定/麻醉药, 全身; 大鼠

**中图分类号:** R614

**文献标识码:** A

## Effect of dexmedetomidine on brain injury in rats undergoing cardiopulmonary bypass\*

Yan-hua Chen, Bing-dong Zhang, Fang He, Li-fang Zhou, Yi Wei, Yu-bo Xie

(The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of dexmedetomidine on attenuating apoptosis of hippocampal neurons in rats undergoing cardiopulmonary bypass (CPB). **Methods** Totally forty-eight Sprague Dawley male rats, weighing 250 to 350 g, were randomly divided into 3 groups ( $n = 16$  each): sham operation group (group S), cardiopulmonary bypass group (group CPB), and dexmedetomidine group (group Dex). In group S, rats needed to be cannulated and did not undergo surgical operation for CPB, which served as sham controls, and the experiment ended after 120 min. In group CPB, all 16 rats underwent surgery to develop CPB for 120 min as model systems. Rats in group CPB did not receive any treatment, which served as CPB control (group CPB). In group Dex, rats received loading doses of dexmedetomidine 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  intravenously using a microinfusion pump 15 min before CPB. Then, doses of dexmedetomidine 2.5  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  were maintained intravenously during the CPB procedure for 120 min. After the experiment, rats in each group were used to detect the plasma levels of IL-6 at different time points by ELISA, neuronal apoptosis in hippocampal CA1 area by TUNEL method, the expression of cleaved Caspase-3

收稿日期: 2018-10-08

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81373498); 广西省自然科学基金(No: 2015GXNSFBA139139); 广西教育厅中青年骨干教师基础能力提升项目(No: KY2016YB079)

[通信作者] 谢玉波, E-mail: xybdoctor@163.com

protein in hippocampus by Western blot and the water content of brain tissue without hippocampus by weighing method. **Results** In group CPB and group Dex, the expressions of IL-6 in plasma at  $T_1$  and  $T_2$  were higher than those at  $T_0$  ( $P < 0.05$ ). Compared with group S, apoptosis of hippocampal neurons in CA1 region, the water content without hippocampus, the expression of IL-6 in plasma and cleaved Caspase-3 protein in hippocampus in group CPB were significantly increased after CPB ( $P < 0.05$ ). Compared with group CPB, apoptosis of hippocampal neurons in CA1 region, the water content without hippocampus, the expression of IL-6 in plasma and cleaved Caspase-3 protein in hippocampus were significantly decreased in group Dex after CPB ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Dexmedetomidine can reduce cerebral injury in CPB rats, and its mechanism may be related to the inhibition of inflammatory response and down regulation of the expression of cleaved Caspase-3 protein.

**Keywords:** brain injuries; cardiopulmonary bypass; dexmedetomidine/ anesthetics; rats

右美托咪定是一种  $\alpha_2$  肾上腺素受体激动剂, 广泛用于临床麻醉和重症监护室的镇静<sup>[1-2]</sup>。研究发现, 右美托咪定可以减轻脑缺血再灌注损伤和体外循环相关的脑损伤, 但其具体机制尚需进一步研究<sup>[3-4]</sup>。为此, 本实验将右美托咪定用于大鼠体外循环中, 观察大鼠海马 CA1 区神经元凋亡、脑组织含水量、血浆中 IL-6 和海马组织 cleaved Caspase-3 蛋白的表达, 探讨右美托咪定在体外循环中的脑保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 250 ~ 350 g, 采用随机数字表法, 将其分为 3 组: 假手术组 (S 组)、体外循环组 (CPB 组) 和右美托咪定组 (Dex 组), 每组 16 只。S 组大鼠仅行动静脉穿刺置管术, 不进行体外循环转流, 120 min 后结束实验; CPB 组行体外循环转流 120 min; Dex 组在体外循环前泵注右美托咪定  $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  (江苏恒瑞医药股份有限公司), 15 min 给完, 接着在体外循环转流过程中持续泵注右美托咪定  $2.5 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  直至体外循环转流结束。

### 1.2 大鼠体外循环模型的复制

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (北京普博斯生物科技有限公司)  $0.5 \text{ ml}/100 \text{ g}$  麻醉大鼠, 仰卧位固定于实验台上, 经口腔将 16 G 静脉留置导管 (美国 Arrow 公司) 插入气管, 行机械通气, 潮气量  $3 \text{ ml}/100 \text{ g}$ , 频率 60 次 /min, 吸呼比为 1.0 : 1.5, 实验中保持动脉血气二氧化碳分压维持在 35 ~ 45 mmHg。颈前区、左右腹股沟处刮毛、消毒后纵向切开皮肤, 右颈外静脉置入 20 G 静脉穿刺针 (北京史密斯医疗器械有限公司) 至右心房, 依靠重力引流静脉血至贮血器 (20 ml

注射器, 山东威高集团医用高分子制品股份有限公司); 右股静脉置入 22 G 静脉穿刺针行股静脉引流; 左、右侧股动脉分别置入 24 G 静脉穿刺针, 右侧股动脉行股动脉灌注, 左侧股动脉用于监测动态血压和行血气分析。体外循环采用右股静脉、右颈外静脉 - 右股动脉转流。体外循环预充液: 13 ml 同种新鲜肝素化大鼠血液、5 ml 乳酸林格液、5 ml 4% 羟乙基淀粉溶液 (重庆大新药业股份有限公司)。静脉给予肝素钠 (上海上药第一生化药业有限公司)  $500 \text{ u}/\text{kg}$ , 待激活全血凝固时间 (ACT)  $\geq 480 \text{ s}$  后, 使用 Stockert III 型双头滚压泵 (德国 Stockert III 公司) 和小动物膜肺 (东莞科威公司) 转流 120 min。术中血气分析采用 i-STAT1 血气分析仪 (美国 ABBOTT 公司), ACT 监测采用 ACT 仪 (美国 Medtroniz 公司)。体外循环期间维持血气分析数值在正常范围, 红细胞压积约为 25%, 灌注流量维持在  $100 \sim 120 \text{ ml}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ , 平均动脉压维持在 75 ~ 90 mmHg, 鼻咽温度约  $36^\circ\text{C}$ 。体外循环转流 120 min 后实验结束。

### 1.3 ELISA 法

每组随机选取 8 只大鼠在体外循环前 ( $T_0$ )、体外循环 1 h ( $T_1$ )、体外循环 2 h ( $T_2$ ) 时采集静脉血用于测定血浆 IL-6 浓度。静脉血标本  $1000 \text{ r}/\text{min}$  离心 15 min, 采集血浆上清液  $-20^\circ\text{C}$  保存, 最后采用 ELISA 试剂盒检测血浆 IL-6 浓度。

### 1.4 TUNEL 检测

每组随机选取 8 只大鼠, 实验结束后经升主动脉灌注生理盐水约 100 ml 至右心耳流出液体为无色, 再灌注  $4^\circ\text{C}$ 、4% 多聚甲醛 (北京百奥莱博科技有限公司) 约 250 ml, 至头颈部变僵硬。断头取脑, 常规石蜡包

埋后行连续冠状面切片,厚度 $4\mu\text{m}$ 。按照 TUNEL 试剂盒(美国 Roche 公司)说明书步骤进行操作,经荧光染色(TUNEL、DAPI、Merge 染色)后观察细胞凋亡情况。细胞质或细胞核中出现较亮的绿色颗粒为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片随机选取 CA1 区 3 个不同高倍视野(200 倍),以平均密度比表示凋亡阳性细胞数,平均密度比 = 积分光密度 / 选定对象的面积,取 3 次平均值。

### 1.5 Western blotting 检测

将剩余每组 8 只大鼠取新鲜海马组织,按照蛋白提取试剂盒说明书提取组织蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量。取  $50\mu\text{g}$  蛋白加入上样缓冲液,蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳。分离蛋白转移至 PVDF 膜,牛奶封闭 2h, TBST 洗膜后分别加入兔单克隆抗体 cleaved Caspase-3 (1 : 1 000, 美国 Cell Signaling Technology 公司)和兔抗 ACTB 多克隆抗体(1 : 3 000, 美国 Bioworlde 公司), $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 洗膜后加入红外标记的二抗(1 : 10 000, 美国 Cell Signaling Technology 公司),室温下避光孵育 2 h, 曝光成像。采用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫膜,灰度值用 Imaga J 软件测定,以目的蛋白和内参  $\beta$ -actin 蛋白灰度比值表示 cleaved Caspase-3 蛋白的相对表达量。

### 1.6 脑组织含水量的测定

将每组 8 只大鼠去掉海马后的脑组织称湿重,置于  $55^{\circ}\text{C}$  干燥箱内烘干 24 h 至恒重,称干重。计算脑含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重  $\times 100\%$ 。

### 1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计学软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差表示 ( $\bar{x} \pm s$ ), 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠不同时间血浆 IL-6 浓度比较

CPB 组、Dex 组与 S 组  $T_0$ 、 $T_1$ 、 $T_2$  的血浆 IL-6 浓度比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的血浆 IL-6 浓度有差异 ( $F = 134.07$ ,  $P = 0.000$ ); ② 3 组血浆 IL-6 浓度有差异 ( $F = 29.918$ ,  $P = 0.000$ ), CPB 组较 S 组高 ( $P < 0.05$ ), Dex 组较 CPB 组低 ( $P < 0.05$ ); ③ 3 组血浆 IL-6 浓度变化趋势有差异 ( $F = 21.638$ ,  $P = 0.000$ )。见表 1 和图 1。

表 1 各组大鼠不同时间血浆 IL-6 浓度比较

( $n = 8$ ,  $\text{pg/ml}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	$T_0$	$T_1$	$T_2$
S 组	$9.42 \pm 0.62$	$10.93 \pm 1.59$	$11.13 \pm 1.41$
CPB 组	$9.95 \pm 1.18$	$17.76 \pm 2.77^{1)2)}$	$19.37 \pm 2.40^{1)2)}$
Dex 组	$9.91 \pm 1.67$	$16.57 \pm 1.19^{1)2)}$	$15.22 \pm 1.82^{2)3)}$

注: 1) 与 S 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与  $T_0$  比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与 CPB 组比较,  $P < 0.05$

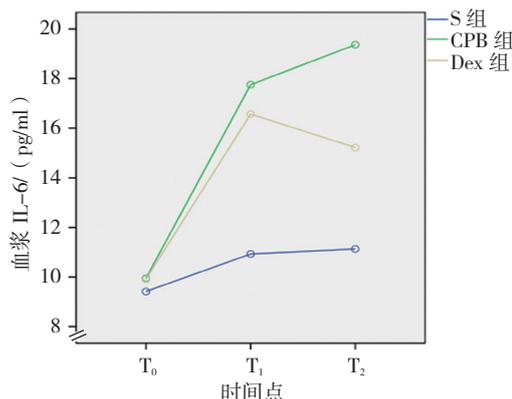


图 1 各组大鼠血浆 IL-6 浓度的变化趋势 ( $n = 8$ )

### 2.2 各组大鼠海马 CA1 区凋亡阳性细胞和脑组织含水量比较

免疫荧光染色后, 可见凋亡细胞质或细胞核中出现较亮的绿色颗粒, 正常细胞核呈蓝色。大鼠海马 CA1 区的 TUNEL 染色图片中, S 组和 Dex 组可见少量散在绿色颗粒, 而 CPB 组可见较多绿色颗粒(见图 2)。CPB 组、Dex 组、S 组大鼠 CA1 区的凋亡阳性细胞数比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 96.732$ ,  $P = 0.000$ ); 进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, CPB 组较 S 组凋亡阳性细胞多 ( $P < 0.05$ ); Dex 组较 CPB 组少 ( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

CPB 组、Dex 组、S 组脑组织含水量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 5.431$ ,  $P = 0.013$ ); 进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, CPB 组高于 S 组 ( $P < 0.05$ ); Dex 组低于 CPB 组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 各组大鼠海马 CA1 区 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平比较

各组大鼠海马 CA1 区 cleaved Caspase-3 蛋白在 17 kD 左右出现特异性条带(见图 3)。CPB 组、Dex 组、S 组海马组织 cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量分别为 ( $0.89 \pm 0.03$ )、( $0.63 \pm 0.06$ ) 和 ( $0.60 \pm 0.06$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 76.244$ ,  $P = 0.000$ ); 进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, CPB 组高于 S 组 ( $P < 0.05$ ); Dex 组低于 CPB 组 ( $P < 0.05$ )。

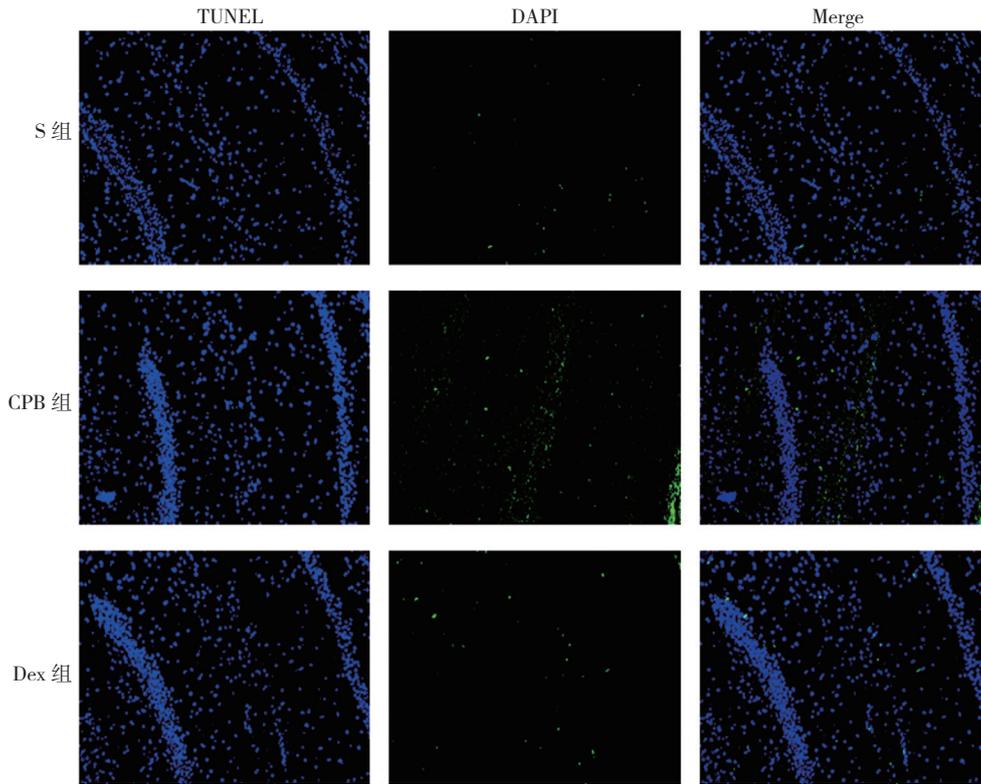


图 2 各组大鼠海马 CA1 区的凋亡阳性细胞 (荧光染色 × 200)

表 2 各组大鼠 CA1 区凋亡阳性细胞和脑组织含水量比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡阳性细胞 (个/mm <sup>2</sup> )	脑组织含水量 /%
S 组	2.23 ± 0.74	77.07 ± 1.55
CPB 组	8.97 ± 1.27 <sup>1)</sup>	79.65 ± 1.62 <sup>1)</sup>
Dex 组	5.98 ± 0.81 <sup>2)</sup>	77.49 ± 1.86 <sup>2)</sup>
F 值	96.732	5.431
P 值	0.000	0.013

注: 1) 与 S 组比较, P < 0.05; 2) 与 CPB 组比较, P < 0.05



图 3 各组大鼠海马组织 cleaved Caspase-3 蛋白的表达

### 3 讨论

体外循环是一种非生理状态, 血液与体外循环管道等接触时可以产生大量炎症因子, 激活补体, 引起全身炎症反应, 导致全身组织器官损害<sup>[5-6]</sup>。体外循环心脏外科手术后出现认知功能障碍和脑损伤等<sup>[7]</sup>, 会

延长患者术后恢复时间, 增加患者住院日, 增加病死率和医疗费用等, 因此减轻体外循环相关的脑损伤非常迫切。

研究表明, 右美托咪定对脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 其机制可能与右美托咪定减少氧化应激和炎症反应有关<sup>[8-9]</sup>。IL-6 是一个重要的促炎因子, 可以激活细胞内信号传导通路<sup>[10]</sup>。Caspase-3 是与凋亡相关的一种调解蛋白<sup>[11]</sup>, 其激活可以诱导细胞凋亡增多, 所以细胞凋亡增加时, 可发现 cleaved Caspase-3 表达增多<sup>[12]</sup>。

本研究结果显示, 体外循环可以引起大鼠脑组织水肿加重和海马神经元凋亡增多, 并且促进 IL-6 和凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3 的表达; 使用右美托咪定可以减轻体外循环导致的大鼠脑组织水肿和减少大鼠海马神经元细胞凋亡, 下调炎症因子 IL-6 和凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3 的表达, 说明右美托咪定对大鼠体外循环有脑保护作用。

综上所述, 体外循环可以诱导大鼠海马神经元凋亡增多, 而右美托咪定可以减轻大鼠体外循环相关的脑损伤, 其机制可能与其减轻体外循环相关的炎症反应, 下调 cleaved Caspase-3 蛋白表达有关。

## 参 考 文 献:

- [1] LIU X, ZHANG K, WANG W, et al. Dexmedetomidine sedation reduces atrial fibrillation after cardiac surgery compared to propofol: a randomized controlled trial[J]. *Crit Care*, 2016, 20(1): 298.
- [2] WANG Z, CHEN Q, GUO H, et al. Effects of dexmedetomidine on H-FABP, CK-MB, cTnI levels, neurological function and near-term prognosis in patients undergoing heart valve replacement[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5851-5856.
- [3] AKPINAR O, NAZIROGLU M, AKPINAR H. Different doses of dexmedetomidine reduce plasma cytokine production, brain oxidative injury, PARP and caspase expression levels but increase liver oxidative toxicity in cerebral ischemia-induced rats[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 130: 1-9.
- [4] PAN W, WANG Y, LIN L, et al. Outcomes of dexmedetomidine treatment in pediatric patients undergoing congenital heart disease surgery: a meta-analysis[J]. *Paediatr Anaesth*, 2016, 26(3): 239-248.
- [5] FUNAMOTO M, MASUMOTO H, TAKAORI K, et al. Green tea polyphenol prevents diabetic rats from acute kidney injury after cardiopulmonary bypass[J]. *Ann Thorac Surg*, 2016, 101(4): 1507-1513.
- [6] TIRILOMIS T, BENSCH M, WALDMANN-BEUSHAUSEN R, et al. Myocardial histology and outcome after cardiopulmonary bypass of neonatal piglets[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2015, 10: 170.
- [7] PATEL N, MINHAS J S, CHUNG E M. Risk factors associated with cognitive decline after cardiac surgery: a systematic review[J]. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2015, DOI: org/10.1155/2015/370612.
- [8] ZENG X, WANG H, XING X, et al. Dexmedetomidine protects against transient global cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative stress and inflammation in diabetic rats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): DOI: 10.1371/journal.pone.e0151620.
- [9] BULOW N M, COLPO E, PEREIRA R P, et al. Dexmedetomidine decreases the inflammatory response to myocardial surgery under mini-cardiopulmonary bypass[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2016, 49(4): DOI: org/10.1590/1414-431X20154646.
- [10] SAYED S, IDRIS N K, SAYYEDF H G, et al. Effects of propofol and isoflurane on haemodynamics and the inflammatory response in cardiopulmonary bypass surgery[J]. *Br J Biomed Sci*, 2015, 72(3): 93-101.
- [11] KIM Y R, KIM H N, JANG J Y, et al. Effects of electroacupuncture on apoptotic pathways in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(6): 1303-1310.
- [12] YANG Y, ZHANG X J, LI L T, et al. Apelin-13 protects against apoptosis by activating AMP-activated protein kinase pathway in ischemia stroke[J]. *Peptides*, 2016, 75: 96-100.

( 董颖丹 编辑 )