

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.19.002

文章编号: 1005-8982 (2020) 19-0007-08

右美托咪定减轻兔脊髓缺血再灌注损伤的 机制研究*

樊晓娜, 刘娇, 池卉, 袁芬, 胡霖

(华中科技大学同济医学院附属梨园医院 麻醉科, 湖北 武汉 430077)

摘要: 目的 探讨右美托咪定 (Dex) 对兔脊髓缺血再灌注损伤 (SCIRI) 的保护作用及潜在分子机制。**方法** 采用成年新西兰大耳白兔复制 SCIRI 模型。实验一: 42 只兔随机分为 7 组, 分别于灌注前 (0 h) 及再灌注后 3 h、6 h、12 h、24 h、36 h 及 48 h 7 个不同时间点, 用 Western blotting 法检测脊髓组织磷酸化的 Janus 激酶 2 (p-JAK2)、磷酸化的信号转导与转录激活因子 3 (p-STAT3) 的表达。实验二: 36 只兔随机分为对照组 (Sham 组)、缺血再灌注组 (I/R 组) 及 Dex 干预组 (Dex+I/R 组)。Sham 组分离腹主动脉后, 不做缺血处理。I/R 组和 Dex+I/R 组, 分离腹主动脉并夹闭 30 min, 以诱导脊髓组织缺血。脊髓缺血前 30 min, Dex+I/R 组静脉给予 Dex [10 μ g / (kg · h)], 直至再灌注后 1 h。再灌注后 48 h 对兔后肢运动功能进行 Tarlov 评分, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察脊髓组织病理学改变, 原位末端转移酶标记 (TUNEL) 检测神经细胞凋亡情况, 伊文思蓝检测血-脑屏障的渗透性, Western blotting 法检测脊髓组织 p-JAK2、p-STAT3、活化型半胱天冬酶-3 (Cleaved Caspase-3)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 的表达。**结果** 实验一: 与灌注前 (0 h) 比较, 再灌注后 6 h、12 h、24 h 及 36 h 脊髓组织 p-JAK2、p-STAT3 的表达增加 (均 $P < 0.05$), 并于 24 h 到达峰值。实验二: 再灌注后 48 h, Dex+I/R 组的 Tarlov 评分增加 ($P < 0.05$), 脊髓组织损伤减轻; Dex 处理能够降低脊髓神经细胞凋亡率 ($P < 0.05$), 并减少脊髓组织中伊文思蓝的渗透量 ($P < 0.05$); Dex 上调 p-JAK2、p-STAT3 的表达 ($P < 0.05$), 并下调 Cleaved Caspase-3、TNF- α 和 IL-6 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 再灌注阶段, 存在 JAK2/STAT3 保护性通路的激活, 但这种激活作用并未维持; Dex 可通过激活 JAK2/STAT3 信号通路、抑制凋亡蛋白 (Cleaved Caspase-3) 和炎症因子 (TNF- α , IL-6) 表达, 从而减少神经细胞凋亡并维持血-脑屏障的完整性, 减轻 SCIRI。

关键词: 脊髓缺血再灌注损伤; 右美托咪定; JAK2/STAT3; 凋亡; 血-脑屏障

中图分类号: R651.2

文献标识码: A

Therapeutic effects and mechanisms of dexmedetomidine on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits*

Xiao-na Fan, Jiao Liu, Hui Chi, Fen Yuan, Ji Hu

(Department of Anesthesiology, Liyuan Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430077, China)

Abstract: Objective To investigate the role of a combination of per- and post-conditioning of dexmedetomidine (Dex) in rabbits with spinal cord ischemia-reperfusion injury (SCIRI). **Methods** Adult New Zealand white rabbits were used to replicate the SCIRI model. Experiment 1: Animals (42) were randomly divided into seven groups to evaluate the time-course expression of p-JAK2 and p-STAT3 after reperfusion. Experiment 2: Animals (36) were randomly divided into three groups: Sham, I/R and Dex+I/R. For the I/R group and I/R+DEX group, the abdominal aorta of the rabbits was clamped for 30 min to establish the model of SCIRI, while the rabbits in the Sham group

收稿日期: 2020-04-10

* 基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (No: 2016YXZD024, 2017KFYXJJ085, 2018KFYYXJJ118)

only undergoing arterial dissociation. Dex (10 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$) was administered intravenously 30 min before ischemia until 1 h after reperfusion. Hind limb motor function was assessed using the modified Tarlov scale score at 48 h after reperfusion. Histopathological changes and neuronal apoptosis in the ventral grey matter were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The permeability of the blood-spinal cord barrier (BSCB) was examined via Evans blue (EB) extravasation. The protein expressions of p-JAK2, p-STAT3, Cleaved Caspase-3, TNF- α , and IL-6 were detected by Western blotting. **Results** Experiment 1: Compared with the 0 h group, the expression of p-JAK2 and p-STAT3 in the spinal cord tissue were increased at 6 h, 12 h, 24 h, and 36 h after reperfusion (all $P < 0.05$), and reached a peak at 24 h. Experiment 2: At 48 h after reperfusion, Dex treatment significantly increased Tarlov score ($P < 0.05$) and alleviated the histological damage of spinal cord in rabbits; Dex treatment markedly reduced neuronal apoptosis ($P < 0.05$) and decreased EB content in spinal cord tissue ($P < 0.05$); Dex significantly up-regulated the expression of p-JAK2 and p-STAT3 (both $P < 0.05$), and down-regulated the expression of Cleaved Caspase-3, TNF- α , and IL-6 (all $P < 0.05$). **Conclusions** In the reperfusion phase, JAK2 / STAT3 protective pathway is activated, but it is not maintained. Combination of per- and postconditioning of Dex provided neuroprotection against spinal cord ischemia-reperfusion injury through inhibiting neuronal apoptosis and maintaining BSCB integrity, which may be related to its activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway and the suppression of Cleaved Caspase-3, TNF- α , and IL-6.

Keywords: spinal cord ischemia-reperfusion; dexmedetomidine; JAK2/STAT3; apoptosis; blood-spinal cord barrier

α_2 肾上腺素受体激动剂——右美托咪定 (Dexmedetomidine, Dex), 因其优越的抗焦虑及镇静作用, 被广泛应用于临床麻醉和重症监护^[1]。此外, 它对神经系统的保护作用, 在体内外动物模型中均已得到证实^[2-3]。研究表明, 在脊髓缺血前及缺血期给予实验动物 Dex, 可显著增加其脊髓神经元的存活率^[4]。然而, 当 Dex 被持续应用至再灌注期间时, 其效应及效应机制如何, 尚未明确。信号转导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是一种调节编码参与多种过程的蛋白质基因表达的转录因子, 包括炎症、凋亡、血管生成、细胞信号转导和细胞应激反应等^[5]。研究表明, Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /STAT3 信号通路的激活, 能够通过其抗凋亡及抗炎等作用机制, 保护器官组织免受缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 损伤^[6-7]。在小鼠脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCIRI) 模型中, OSUKA 等^[8]也认为磷酸化的 STAT3 可通过转运至细胞核, 刺激相关基因转录, 减轻神经组织损伤。而 Dex 对 JAK2/STAT3 通路的这种激活作用, 在脑保护相关机制研究中已经得到证实^[9]。那么, Dex 对 SCIRI 的减轻作用是否与其激活 JAK2/STAT3 信号通路, 进而调节下游信号分子的表达, 以抑制脊髓炎症及神经细胞凋亡有关, 未有相关研究报道。本研究将通过复制兔 SCIRI 模型, 探讨 Dex 对 SCIRI 的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

兔抗 p-JAK2 (美国 Biocompare 公司), p-STAT3 (中国博奥森生物技术有限公司), 活化型半胱天冬酶 -3 (Cleaved Caspase-3) (英国 Abcam 公司), 肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、白细胞介素 -6 (IL-6) (美国 Lsbio 公司) 抗体, 山羊抗兔二抗、RIPA 总蛋白裂解液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、5 \times 蛋白上样缓冲液 (南非 Aspen 公司), 原位末端转移酶标记 (TUNEL) 试剂盒 (瑞士 Roche 公司), DAPI 染液 (中国阿斯本生物技术有限公司)。超净工作台 (中国苏净安泰空气技术有限公司), 酶标仪 (美国 Diatek 公司), 普通光学显微镜、倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 成像系统 (美国 Q-Imaging 公司)。

1.2 实验动物及模型复制方法

健康成年新西兰大耳白兔 78 只, 体重 2.0 ~ 2.2 kg (湖北逸擎诚生物科技有限公司提供)。兔左耳缘静脉穿刺置管后, 用戊巴比妥钠静脉注射 (30 mg/kg) 麻醉。根据其生命体征和肌肉松弛情况, 静脉滴注 1% 戊巴比妥钠维持麻醉。应确保动物能自主呼吸, 并用电热毯保温使直肠温度保持在 (38.5 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。术中监测中心动脉血压、心率和血氧饱和度。采用改良的 Zivin 方法复制 SCIRI 模型^[10]。首先, 将动物置于仰卧位, 剃毛和消毒后, 行胸腹正中切口。然后在肾动脉

水平分离腹主动脉,并在距左肾动脉入口 0.5 cm 远的腹主动脉上放置动脉夹以诱导缺血。30 min 后移除动脉夹。仔细检查动脉壁及脏器无损伤后,关闭腹腔。手术后,所有实验动物肌内注射庆大霉素 4 万 u 以防止感染,送回笼子喂养。实验程序符合华中科技大学同济医学院动物实验伦理准则(2018-0630)。

1.3 实验分组及过程

1.3.1 实验一 为测定 Dex 未干预情况下, SCIRI 过程中 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达情况,将 42 只新西兰大耳白兔随机分为假手术组(0 h 组)、再灌注后 3 h、6 h、12 h、24 h、36 h 及 48 h 组,每组 6 只。按 1.2 中方法复制 SCIRI 模型,于再灌注后相应时间点,兔耳缘静脉注入空气 20 ml 处死各组实验兔,同 1.7 中所述实验方法,取脊髓组织检测 p-JAK2、p-STAT3 的表达。

1.3.2 实验二 将 36 只新西兰大耳白兔随机分为假手术组(Sham 组)、缺血再灌注损伤组(I/R 组)和 Dex 干预组(Dex+I/R 组),每组 12 只。Dex+I/R 组:按 1.2 中方法复制 SCIRI 模型,于缺血前 30 min 将 Dex 以 10 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 的剂量从兔左耳缘静脉泵入,持续时间至再灌注后 1 h。I/R 组:按 1.2 中方法复制 SCIRI 模型,于缺血前 30 min 从兔左耳缘静脉泵入与 Dex 等体积的生理盐水,直至再灌注后 1 h。Sham 组:按 1.2 中方法,分离出腹主动脉,但不夹闭;与 I/R 组相同,从兔左耳缘静脉泵入生理盐水。各组的研究时间点为再灌注损伤后 48 h,其中 6 只用于血-脑屏障通透性检测,另外 6 只用于其他相关检测。

1.4 神经运动功能评分

再灌注后 48 h,由 1 位不清楚实验设计与分组的康复科医师,采用改良的 Tarlov 评分法^[11],对实验兔(均为实验二动物)后肢运动功能进行评分。评分标准:0 分,无可觉察的后肢活动;1 分,有可觉察的关节自主活动;2 分,后肢可自由活动但无法站立;3 分,后肢可站立但不能正常行走;4 分,神经功能正常。

1.5 苏木精-伊红染色观察各组脊髓组织中神经元形态

运动功能评估完成后,采用随机数字表法,每组取 6 只实验兔,经耳缘静脉内注入空气 20 ml 处死,取 L₄₋₅ 段新鲜脊髓一部分固定于 4% 多聚甲醛中,梯度酒精脱水后行石蜡包埋。修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片,厚 4 μm 。石蜡切片脱蜡至水后,进行苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察脊髓组织病理改变。

1.6 TUNEL 法及 DAPI 染色检测神经细胞凋亡

石蜡切片脱蜡至水后,切片稍甩干,用免疫组织化学笔在组织周围画圈(防止液体流走),滴加蛋白酶 K 工作液覆盖圈内组织,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。加破膜工作液覆盖组织,常温下孵育 10 min。取 TUNEL 试剂盒内适量试剂 1(TdT)和试剂 2(dUTP)按 1:9 混合,覆盖圈内组织,切片平放于湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育 60 min。洗涤,滴加适量 DAPI 染液至切片,室温避光孵育 5 min。洗涤,滴加抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并拍照。荧光显微镜下呈绿色荧光者即为凋亡神经细胞。随机选取 5 个视野,计数各组凋亡神经细胞数目。

1.7 Western blotting 法检测相关蛋白表达

取脊髓的另一部分,提取总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度;制备 12% SDS-PAGE 凝胶,取蛋白样品进行上样、电泳;电泳完毕转至 PVDF 膜,将转好的膜加入封闭液室温封闭 1 h;除去封闭液,加入稀释好的一抗 p-JAK2(1:500)、p-STAT3(1:500)、Cleaved Caspased-3(1:1000)、TNF- α (1:500)及 IL-6(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;洗涤后加入 HRP 标记的二抗(1:10000)室温孵育 30 min。滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液,暗室中曝光、显影。Alpha Ease FC 软件处理系统分析目标条带的灰度值,以目标条带与 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.8 伊文思蓝检测血-脑屏障的渗透性

对各组剩余 6 只实验动物,于再灌注 48 h 后将 2% 伊文思蓝(10 ml/kg)经耳缘静脉缓慢匀速注入。1 h 后再次麻醉动物,打开胸腔暴露心脏,经升主动脉灌注生理盐水 500 ml/kg。取脊髓组织,一部分置入 4% 多聚甲醛内固定,沉糖,置入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻切片机上连续切片(10 μm),于荧光显微镜绿色荧光激发模式下观察(伊文思蓝在绿色荧光激发下呈红色)。另一部分脊髓称重后浸泡于 4 ml 甲酰胺溶液中,60 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 24 h 后离心取上清液,用酶标仪(632 nm 处)检测光密度(OD)值。由绘制的标准曲线计算脊髓组织中伊文思蓝含量。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SCIRI 过程中 p-JAK2 和 p-STAT3 表达情况

再灌注后 3 h、6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 组, 脊髓组织中 p-JAK2 的相对表达量分别为 (0.079 ± 0.039)、(0.137 ± 0.060)、(0.305 ± 0.041)、(0.440 ± 0.054)、(0.197 ± 0.063) 和 (0.112 ± 0.042), 0 h 组表达量为 (0.050 ± 0.022), 7 组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=50.656, P=0.000$); 再灌注后 3 h、6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 组, 脊髓组织中 p-STAT3 的相对表达量分别为 (0.110 ± 0.034)、(0.242 ± 0.053)、(0.449 ± 0.051)、(0.574 ± 0.053)、(0.299 ± 0.040) 和 (0.149 ± 0.036), 0 h 组表达量为 (0.089 ± 0.031), 7 组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=102.635, P=0.000$)。与 0 h 组比较, 再灌注后 6 h, 脊髓组织中 p-JAK2、p-STAT3 的表达升高 ($P<0.05$); 再灌注后 24 h 到达峰值 ($P<0.05$); 再灌注后 48 h, 其表达与 0 h 组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1。

2.2 Dex 对 SCIRI 后运动功能的影响

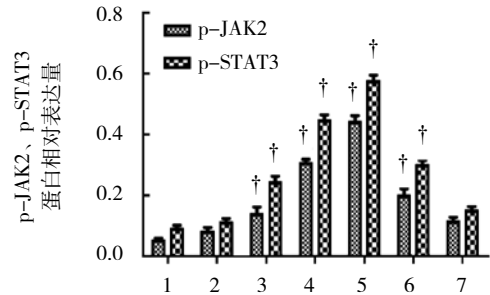
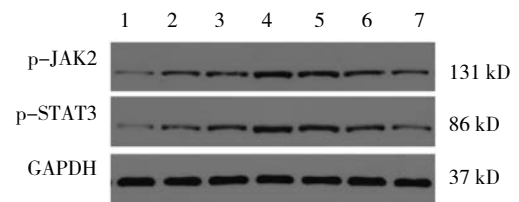
再灌注后 48 h, 各组 Tarlov 评分结果分别为: Sham 组 (4.000 ± 0.000)、I/R 组 (1.500 ± 0.904)、Dex+I/R 组 (2.917 ± 0.668), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=48.145, P=0.000$)。Sham 组均无运动功能障碍; I/R 组评分低于 Sham 组 ($P<0.05$), 其运动功能严重受损; 与 I/R 组比较, Dex+I/R 组评分提高 ($P<0.05$), 其运动功能障碍得到改善。见图 2。

2.3 各组脊髓组织神经元形态

再灌注后 48 h, Sham 组脊髓组织结构完整, 正常神经元数量较多; 神经元呈清晰的多边形结构, 胞浆均质红染; 胞核形态正常、核仁明显。I/R 组脊髓组织结构被严重破坏, 残存的正常神经元数量少, 细胞间可见大量空泡形成; 神经元多边形结构消失; 胞核大量溶解。Dex+I/R 组脊髓组织结构基本完整, 细胞间空泡较少, 正常神经元较 I/R 组多; 神经元多边形结构基本存在; 胞核形态大致正常, 病理变化轻于 I/R 组。见图 3。

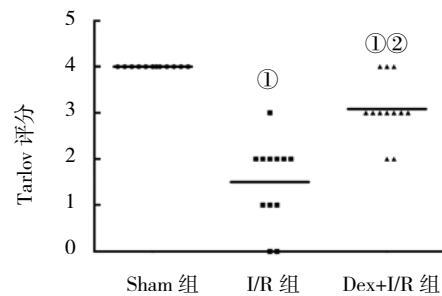
2.4 各组脊髓组织凋亡神经细胞比较

再灌注后 48 h, 各组凋亡神经细胞计数结果: Sham 组 (2.933 ± 1.799)%、I/R 组 (39.967 ± 10.918)%、Dex+I/R 组 (12.867 ± 3.501)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=245.495, P=0.000$)。进一步两两比较, I/R 组高于 Sham 组 ($P<0.05$), Dex+I/R 组低于 I/R 组



1: 0 h 组; 2: 3 h 组; 3: 6 h 组; 4: 12 h 组; 5: 24 h 组; 6: 36 h 组; 7: 48 h 组。† 与 0 h 组比较, $P<0.05$ 。

图 1 各组脊髓组织中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达



①与 Sham 组比较, $P<0.05$; ②与 I/R 组比较, $P<0.05$ 。

图 2 各组神经功能评分

($P<0.05$)。见图 4。

2.5 伊文思蓝在各组脊髓组织中的渗透情况

再灌注后 48 h, Sham 组脊髓组织中几乎未见红色荧光, I/R 组红色荧光显著增强, 而 Dex+I/R 组红色荧光较 I/R 组明显减弱。各组脊髓组织中伊文思蓝的渗透量分别为: Sham 组 (1.757 ± 1.162) $\mu\text{g/g}$ 、I/R 组 (15.985 ± 2.556) $\mu\text{g/g}$ 、Dex+I/R 组 (8.868 ± 2.365) $\mu\text{g/g}$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=67.597, P=0.000$)。I/R 组脊髓组织中的伊文思蓝含量高于 Sham 组 ($P<0.05$), 血-脑屏障渗透性增强; 与 I/R 组比较, Dex+I/R 组的伊文思蓝含量减少 ($P<0.05$), 血-脑屏障渗透性降低。见图 5。

2.6 Dex 对 p-JAK2、p-STAT3、Cleaved Caspase-3、TNF- α 、IL-6 蛋白相对表达的影响

再灌注后 48 h, 各组脊髓组织中 p-JAK2 蛋白相对表达量分别为: Sham 组 (0.056 ± 0.027)、I/R 组 (0.113 ±

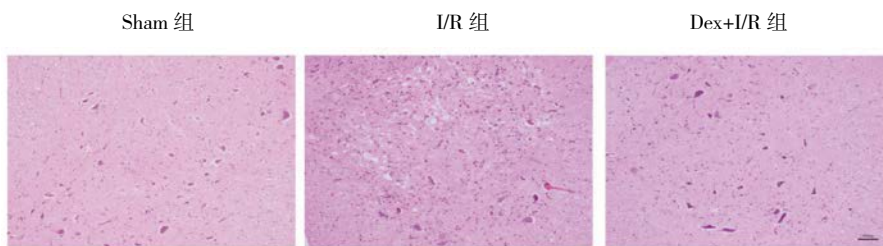
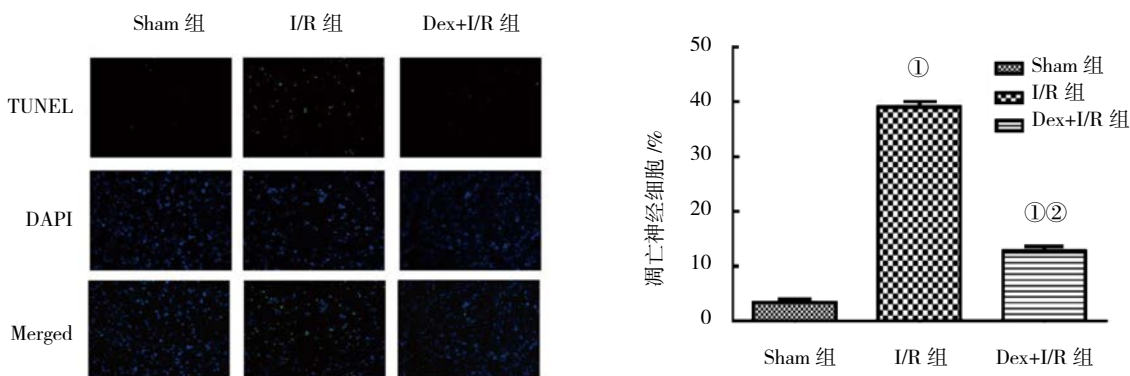
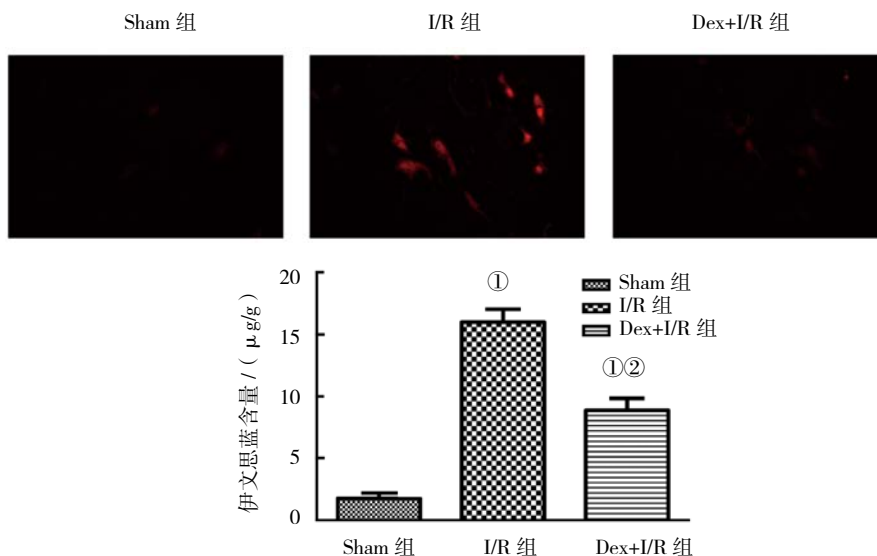


图 3 各组脊髓组织病理学结果 (HE 染色 × 100)



为对比明显, Merged 所示图片为 TUNEL 染色与 DAPI 染色图片的重叠; ①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 I/R 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组脊髓组织凋亡神经细胞比较 (× 100)



①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 I/R 组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 再灌注 48 h 后各组脊髓组织中伊文思蓝含量比较 (× 200)

0.046)、Dex+I/R 组 (0.451 ± 0.055), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 139.649, P = 0.000$); 各组 p-STAT3 蛋白相对表达量分别为: Sham 组 (0.092 ± 0.028)、I/R 组 (0.142 ± 0.044)、Dex+I/R 组 (0.583 ± 0.048), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 261.611, P = 0.000$)。I/R 组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白相对表达量与 Sham 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 Dex+I/R 组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白相对表达量较 I/R

组升高 ($P < 0.05$)。见图 6。

再灌注后 48 h, 各组 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量分别为: Sham 组 (0.054 ± 0.026)、I/R 组 (0.320 ± 0.043)、Dex+I/R 组 (0.155 ± 0.025), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 102.559, P = 0.000$); 各组 TNF- α 蛋白相对表达量分别为: Sham 组 (0.061 ± 0.033)、I/R 组 (0.534 ± 0.072)、Dex+I/R 组 (0.248 ± 0.074), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 87.413,$

$P=0.000$)；各组 IL-6 蛋白相对表达量分别为：Sham 组 (0.148 ± 0.040)、I/R 组 (0.489 ± 0.071)、Dex+I/R 组 (0.288 ± 0.055)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=54.199, P=0.000$)。I/R 组 Cleaved Caspase-3、

TNF- α 及 IL-6 蛋白相对表达量较 Sham 组升高 ($P < 0.05$)；而 Dex+I/R 组 Cleaved Caspase-3、TNF- α 及 IL-6 蛋白相对表达量较 I/R 组降低 ($P < 0.05$)。见图 7、8。

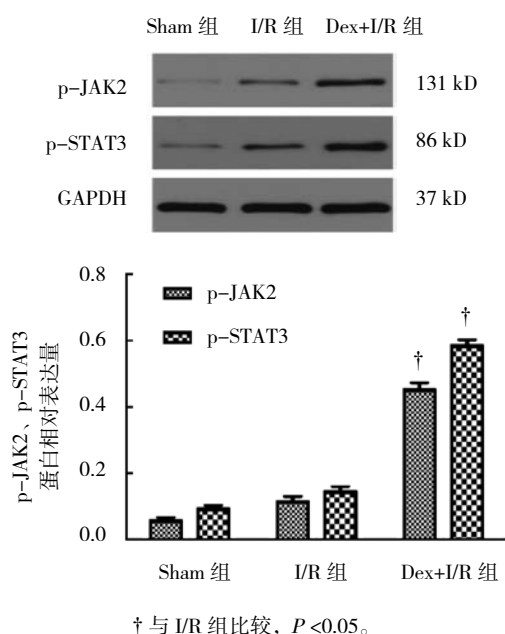


图 6 各组脊髓组织中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达

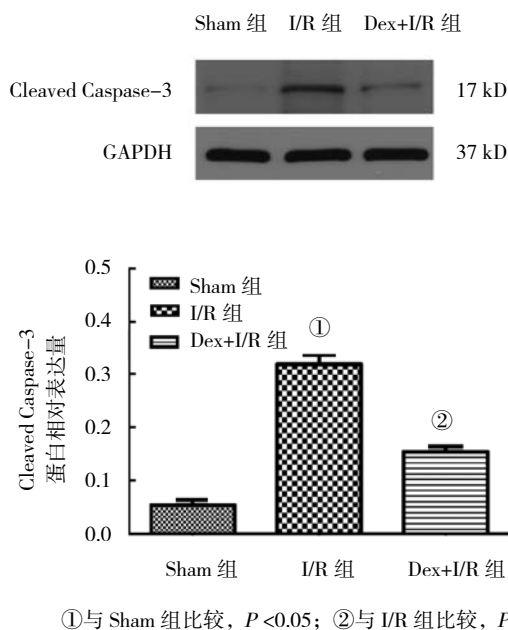
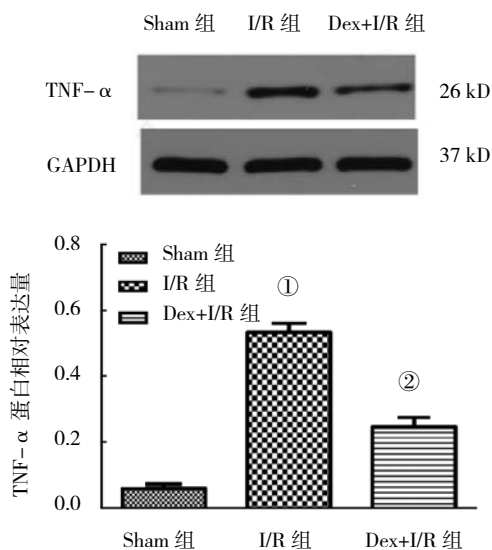
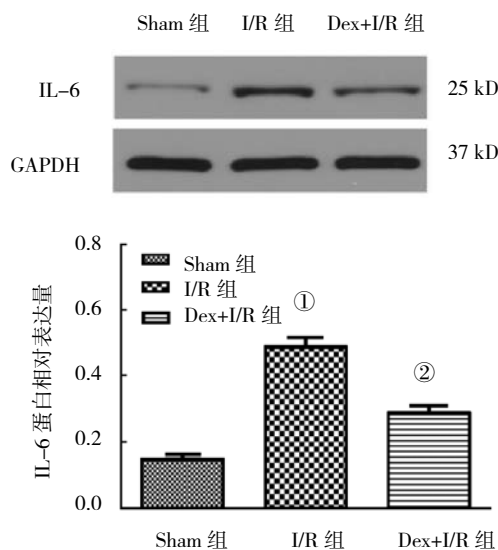


图 7 各组脊髓组织中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达



①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 I/R 组比较, $P < 0.05$ 。

图 8 各组脊髓组织中 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达



3 讨论

SCIRI 作为胸腹主动脉术后最严重的并发症之一，可导致患者严重和长期的残疾。因此，改善这种破坏性状况的新举措具有十分重要的临床意义。本研究结果表明，Dex 在缺血前 30 min 直至再灌注后短期

内 (1 h)，能够改善新西兰大耳白兔 SCIRI 后神经功能障碍，并减轻其脊髓组织学损伤。

在 SCIRI 过程中，导致神经元丢失的病理生理学机制十分复杂。因此，揭示其潜在过程是实施新型神经保护疗法的关键。SCIRI 产生的主要原因是：术中

脊髓组织缺血以及血流再恢复后, 氧自由基大量生成、促炎因子释放和线粒体衰竭等造成“二次损伤”^[12-14]。在这一过程中, 促凋亡信号诱导的运动神经元延迟和选择性死亡, 以及炎症导致的血-脑屏障结构的破坏, 是脊髓不可逆损伤的关键。其中, 细胞凋亡被认为是 SCIRI 后神经元的主要死亡方式^[15]。而血-脑屏障的完整性对维持中枢神经系统稳态和内环境稳定至关重要^[16]。再灌注早期, 血-脑屏障的破裂和出血导致免疫细胞(如中性粒细胞和巨噬细胞)浸润, 引发炎症级联反应, 进一步加重组织损伤^[17]。因此, 对血-脑屏障破坏的早期干预, 可有效预防 SCIRI。本研究结果显示, SCIRI 过程中, Dex 可减少凋亡神经细胞数, 并降低血-脑屏障的渗透性。因此, 在研究剂量内, 对凋亡的抑制和血-脑屏障结构完整性的维持, 可能是 Dex 发挥其神经保护效应的关键。

JAK2/STAT3 信号通路的活化在老鼠器官的 I/R 损伤中发挥关键性的保护作用^[18-19]。Caspase-3 是细胞凋亡信号的主要执行者, 可由外源及内源性途径激活^[20]。在体外通过氧糖剥夺模拟 I/R 损伤发现, 激活的 JAK2/STAT3 信号通路, 可通过提高 Bcl-2/Bax 比值, 从而降低 Cleaved Caspase-3 水平, 保护 HT22 神经细胞免受凋亡^[21]。该调节作用在心肌 I/R 损伤的体外研究中, 同样得到证实^[22]。此外, 活化的 STAT3 还通过抑制下游炎症因子 TNF- α 、IL-6 的表达, 减轻 I/R 损伤^[7, 23]。通过实验一, 本研究发现, 再灌注短期内, JAK2/STAT3 保护性通路被激活, 但这种激活作用并未维持, 这可能是导致 SCIRI 加重的关键, OSUKA 等^[8]的研究结果也证实了这一点。而 Dex 能够激活 JAK2/STAT3 信号通路, 并抑制炎症因子(TNF- α 、IL-6)及凋亡蛋白(Cleaved Caspase-3)的表达。因此, Dex 可减轻 SCIRI 的潜在机制可能与其激活 JAK2/STAT3 信号通路, 从而对炎症与凋亡进行调控有关。

综上所述, 在脊髓缺血前, 直至再灌注短期内连续给予 Dex, 可作为一种相对安全的神经保护策略, 应用于 SCIRI 的预防及治疗过程。此外, 对 JAK2/STAT3 信号通路的调节, 可能为进一步寻找新的脊髓神经保护策略提供分子靶点。再者, 若 Dex 以低剂量的镇静浓度持续应用于再灌注后 48 h, 是否能提供更稳定及有效的神经保护作用, 值得探讨。

参 考 文 献:

- [1] WEERINK M, STRUYS M, HANNIVOORT L N, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexmedetomidine[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2017, 56(8): 893-913.
- [2] WANG S L, DUAN L, XIA B, et al. Dexmedetomidine preconditioning plays a neuroprotective role and suppresses TLR4/NF-kappa B pathways model of cerebral ischemia reperfusion[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1337-1342.
- [3] CHEN L Y, CAO J B, CAO D H, et al. Protective effect of dexmedetomidine against diabetic hyperglycemia-exacerbated cerebral ischemia/reperfusion injury: An in vivo and in vitro study[J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116553.
- [4] SUN Z X, ZHAO T Y, LV S J, et al. Dexmedetomidine attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury through both anti-inflammation and anti-apoptosis mechanisms in rabbits[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 209.
- [5] LEVY D E, LEE C K. What does stat3 do[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1143-1148.
- [6] LIU X X, ZHANG X J, ZHANG J, et al. Diosmin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through activating JAK2/STAT3 signal pathway in mice[J]. *Neuroscience*, 2014, 268: 318-327.
- [7] GE G, ZHANG Q, MA J, et al. Protective effect of salvia miltiorrhiza aqueous extract on myocardium oxidative injury in ischemic-reperfusion rats[J]. *Gene*, 2014, 546(1): 97-103.
- [8] OSUKA K, WATANABE Y, USUDA N, et al. Activation of STAT1 in neurons following spinal cord injury in mice[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(12): 2236-2243.
- [9] SI Y, ZHANG Y, HAN L, et al. Dexmedetomidine acts via the JAK2/STAT3 pathway to attenuate isoflurane-Induced neurocognitive deficits in senile mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e164763.
- [10] BOWES M P, MASLIAH E, OTERO D A, et al. Reduction of neurological damage by a peptide segment of the amyloid beta/A4 protein precursor in a rabbit spinal cord ischemia model[J]. *Exp Neurol*, 1994, 129(1): 112-119.
- [11] TARLOV I M. Acute spinal cord compression paralysis[J]. *J Neurosurg*, 1972, 36(1): 10-20.
- [12] ANWAR M A, AL S T, EID A H. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 98.
- [13] FU S, LV R H, WANG L Q, et al. Resveratrol, an antioxidant, protects spinal cord injury in rats by suppressing MAPK pathway[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(2): 259-266.
- [14] LIU J M, YI Z, LIU S Z, et al. The mitochondrial division inhibitor mdivi-1 attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury both in vitro and in vivo: Involvement of BK channels[J]. *Brain Res*, 2015, 1619: 155-165.
- [15] KATO H, KANELLOPOULOS G K, MATSUO S, et al. Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat[J]. *Exp Neurol*, 1997, 148(2): 464-474.
- [16] BARTANUSZ V, JEZOVA D, ALAJAJIAN B, et al. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications[J]. *Ann Neurol*, 2011, 70(2): 194-206.

- [17] 余奇劲, 解立杰, 胡霁. 脊髓缺血再灌注损伤与血脊髓屏障关系的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(12): 2066-2068.
- [18] LI Y R, ZHANG X J, CUI L L, et al. Salvianolic acids enhance cerebral angiogenesis and neurological recovery by activating JAK2/STAT3 signaling pathway after ischemic stroke in mice[J]. J Neurochem, 2017, 143(1): 87-99.
- [19] XIE X J, FAN D M, XI K, et al. Suppression of microRNA-135b-5p protects against myocardial ischemia/ reperfusion injury by activating JAK2/STAT3 signaling pathway in mice during sevoflurane anesthesia[J]. Biosci Rep, 2017, 37(3): BSR20170186.
- [20] JULIEN O, WELLS J A. Caspases and their substrates[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(8): 1380-1389.
- [21] WANG B D, GUO H, LI X, et al. Adiponectin attenuates oxygen-glucose deprivation-induced mitochondrial oxidative injury and apoptosis in hippocampal HT22 cells via the JAK2/STAT3 pathway[J]. Cell Transplant, 2018, 27(12): 1731-1743.
- [22] LI Y, SHI X J, LI J, et al. Knockdown of KLF11 attenuates hypoxia/reoxygenation injury via JAK2/STAT3 signaling in H9c2[J]. Apoptosis, 2017, 22(4): 510-518.
- [23] CHEN X X, NIE X K, MAO J M, et al. Perfluorooctanesulfonate induces neuroinflammation through the secretion of TNF-alpha mediated by the JAK2/STAT3 pathway[J]. Neurotoxicology, 2018, 66: 32-42.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 樊晓娜, 刘娇, 池卉, 等. 右美托咪定减轻兔脊髓缺血再灌注损伤的机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(19): 7-14.