

右美托咪定减轻脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤的作用

秦智刚^{1,2} 徐尤年³ 李 锐⁴

摘要 目的 探索右美托咪定(Dex)后处理对脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤及转录因子E2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路的影响。方法 将30只SD大鼠随机分为假手术组、模型组和Dex组各10只。模型组和Dex组参照改良Longa法制备脑动脉缺血再灌注模型。Dex组于再灌注即刻腹腔注射100 μg/kg的Dex(浓度为10 mg/L)。再灌注24 h后,对各组大鼠进行神经功能缺失评分; TTC染色法检测大鼠脑梗死体积分数; ELISA法测定脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)的水平; 实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹(Western blot)检测B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved caspase-3)、转录因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶(HO-1)和醌氧化还原酶1(NQO-1)的表达水平; HE染色和TUNEL染色检测脑组织损伤。结果 与假手术组相比,模型组和Dex组大鼠神经功能缺失评分、细胞凋亡率、MDA和NO水平升高($P < 0.05$)。脑组织SOD活性下降($P < 0.05$), Nrf2、HO-1、NQO-1、cleaved caspase-3/Bcl-2、Bax/Bcl-2的表达上调($P < 0.05$); 与模型组相比, Dex组大鼠神经功能缺失评分和脑梗死体积分数、细胞凋亡率、MDA和NO水平下降($P < 0.05$)。脑组织SOD活性升高($P < 0.05$), Nrf2、HO-1、NQO-1的表达上调($P < 0.05$), cleaved caspase-3/Bcl-2、Bax/Bcl-2的表达下调($P < 0.05$), HE染色显示脑组织病理变化减轻。结论 Dex后处理可以减轻CIRI大鼠的氧化应激损伤,其作用机制可能与激活Nrf2/ARE信号通路有关。

关键词 脑缺血再灌注; 右美托咪定; 氧化应激

中图分类号 R 971.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0072-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.014

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfu-

sion injury, CIRI) 常见于心肺复苏、脑外伤等脑缺血低氧后的再灌注过程,临床尚无有效的治疗手段。研究^[1]显示, CIRI的发生可能与机体过量的氧自由基、炎症反应、细胞凋亡等有关。转录因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路是机体内最重要的抗氧化应激系统,可以抵抗内外界的氧化应激,应对各种外来损伤^[2]。研究^[3]显示, Nrf2/ARE信号通路在CIRI的发生发展中具有重要作用,可以清除机体过多的氧自由基,保护脑组织损伤。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)是一种临床常用的镇静剂,近年来研究显示Dex可以减少炎症因子的释放,减轻脑组织炎性损伤,但其对CIRI的氧化应激损伤尚不清楚^[4]。该研究分析了Dex对CIRI大鼠Nrf2/ARE信号通路的影响,旨在为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物 多功能酶标检测仪(iMark680)购自美国Bio-Rad公司; Dex注射液(国药准字H20183219)购自江苏扬子江药业集团有限公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和NO检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 标记二抗的辣根过氧化物酶, 购于丹麦DAKO公司; RT-PCR试剂盒购自上海恒斐生物科技有限公司; B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved caspase-3)、Nrf2、血红素加氧酶(hemeoxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶1(quinone oxidoreductase 1, NQO-1)单克隆抗体均购于美国Santa Cruz公司; SPF级SD雄性大鼠30只, 6~8周龄, 体质量均为(240 ± 10) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[动物许可证号: SCXK(沪)2017-0005], 饲养于北大医疗株洲恺德医院动物中心实验室, 自由摄食与饮水。

1.2 动物造模及给药 将30只SD大鼠随机分为假手术组、模型组和Dex组各10只。模型组和Dex组大鼠采用Longa法制备大鼠CIRI模型^[5], 常规麻

2020-07-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81402508)

作者单位: ¹北大医疗株洲恺德医院麻醉科 株洲 412000

²泰康同济(武汉)医院麻醉科 武汉 430014

³华中科技大学同济医学院附属武汉协和医院麻醉科 武汉 430203

⁴武汉大学人民医院普外科 武汉 430060

作者简介: 秦智刚, 男, 本科, 副主任医师;

徐尤年, 男, 主治医师, 博士, 责任编辑, E-mail: vbf52gn@163.com

醉 采用 MCAO 栓线结扎脑中动脉 缺血 120 min 后拔出栓线实现脑组织的再灌注; 假手术组仅插入栓线 不结扎。Dex 组于再灌注后即刻腹腔注射 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Dex(浓度为 10 mg/L); 模型组和假手术组腹腔注射等体积 0.9% 氯化钠溶液。

1.3 各组大鼠神经体征缺失评分和脑梗死体积分数 再灌注 24 h 后, 参照 Zea Longa 5 分制标准^[6] 进行神经体征缺失评分。处死大鼠, 取大鼠缺血区脑组织, 氯化三苯基四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 染色法计算脑梗死体积分数。

1.4 各组大鼠脑组织损伤检测 取甲醛固定的大鼠脑缺血区组织, 制作切片, 分别进行 HE 染色和 TUNEL 染色, 显微镜下观察组织的病理变化和阳性细胞数, 计算细胞凋亡率; 严格按照试剂盒说明操作染色。

1.5 脑组织中 SOD、MDA 和 NO 测定 取新鲜的大鼠脑缺血区组织, 严格按照试剂盒说明, 采用 ELISA 法测定脑组织中 SOD、MDA、NO 水平。

1.6 RT-PCR 检测脑组织 Nrf2、HO-1、NQO-1 mRNA 的表达 取新鲜的大鼠脑缺血组织匀浆, 按照试剂盒操作提取总 RNA 经反转录合成 cDNA, 参考已有研究^[7] 进行 RT-PCR 反应。

1.7 Western blot 检测脑组织 Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase-3 的表达 取新鲜的大鼠脑缺血组织, 匀浆, 提取总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭, 加一抗 (Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase-3, 稀释比例均为 1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加二抗室温孵育 2 h, 显影, 以 β -actin 为内参, 凝胶成像分析系统对比条带强弱。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 满足正态性的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两样本独立 t 检验比较两组间差异, 单因素方差分

析比较三组间差异性, 若组间比较有差异, 采用 SNK- q 比较三组中两两组间差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIRI 大鼠的神经功能缺失评分和脑组织梗死体积分数 与模型组相比, Dex 组大鼠神经功能缺失评分和脑梗死体积分数降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 大鼠的神经功能缺失评分和脑组织梗死面积 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	神经功能缺失评分(分)	脑梗死体积分数(%)
模型	3.64 \pm 0.47	33.85 \pm 6.24
Dex	2.87 \pm 0.35	25.39 \pm 4.38
t 值	4.155	3.509
P 值	<0.001	0.003

2.2 CIRI 大鼠脑组织损伤 假手术组大鼠脑组织细胞结构完整, 未见明显异常; 模型组大鼠脑组织缺血区皮质出现水肿, 胞间隙变宽, 细胞核固缩深染, 出现变性和坏死区; Dex 组大鼠脑缺血区皮质病理损伤减轻。见图 1。

2.3 CIRI 大鼠脑组织细胞凋亡 与假手术组相比, 模型组和 Dex 组大鼠脑组织细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, Dex 组脑组织细胞凋亡率下降 ($P < 0.05$)。与假手术组相比, 模型组和 Dex 组大鼠脑组织 cleaved caspase-3/Bcl-2、Bax/Bcl-2 的表达上调 ($P < 0.05$); 与模型组相比, Dex 组大鼠脑组织 cleaved caspase-3/Bcl-2、Bax/Bcl-2 的表达下调 ($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

2.4 CIRI 大鼠脑组织 SOD 和 MDA 水平 与假手术组相比, 模型组和 Dex 组大鼠脑组织 SOD 活性下降 ($P < 0.05$), MDA 和 NO 水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, Dex 组大鼠脑组织 SOD 活性升高 ($P < 0.05$), MDA 和 NO 水平下降 ($P < 0.05$), 见表 3。

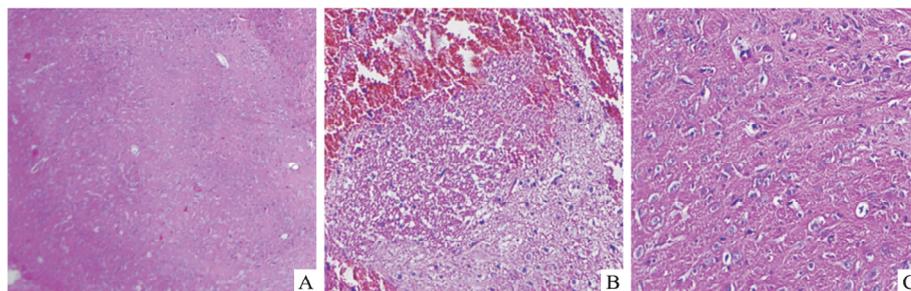


图 1 大鼠脑组织病理损伤 HE $\times 200$

A: 假手术组; B: 模型组; C: Dex 组

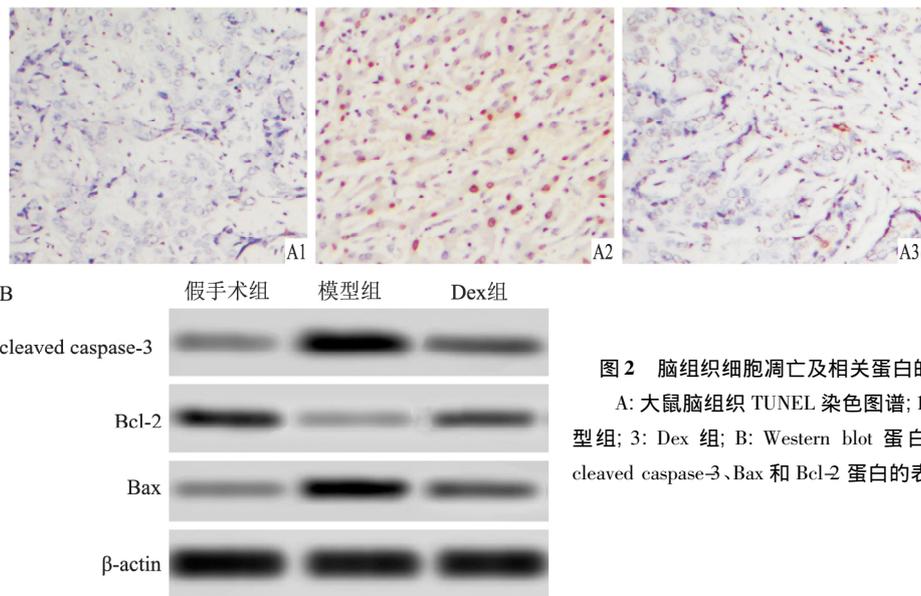


图2 脑组织细胞凋亡及相关蛋白的表达 ×200
A: 大鼠脑组织 TUNEL 染色图谱; 1: 假手术组; 2: 模型组; 3: Dex 组; B: Western blot 蛋白检测脑组织中 cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

表2 脑组织细胞凋亡及相关蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	细胞凋亡率 (%)	cleaved caspase-3 / Bcl-2	Bax/Bcl-2
假手术	9.77 ± 1.52	0.72 ± 0.08	0.65 ± 0.08
模型	34.52 ± 4.59*	3.16 ± 0.38*	2.84 ± 0.33*
Dex	21.63 ± 3.44*	1.33 ± 0.16* #	1.27 ± 0.15* #
F 值	125.558	274.223	277.409
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

表3 脑组织 SOD 和 MDA 水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	NO (nmol/ml)
假手术	313.38 ± 48.22	8.54 ± 1.68	2.86 ± 0.52
模型	219.59 ± 38.45*	17.37 ± 4.17*	11.34 ± 2.78*
Dex	271.50 ± 42.37* #	13.82 ± 3.24* #	7.74 ± 1.56* #
F 值	11.829	19.286	52.090
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.5 CIRI 大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、NQO-1 mRNA 表达 与假手术组相比,模型组和 Dex 组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 mRNA 的表达上调 ($P < 0.05$);与模型组相比,Dex 组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 mRNA 的表达上调 ($P < 0.05$),见表 4。

2.6 CIRI 大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、NQO-1 蛋白表达 与假手术组相比,模型组和 Dex 组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白的表达上调 ($P < 0.05$);与模型组相比,Dex 组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白的表达上调 ($P < 0.05$),见图 3、表 5。

表4 脑组织 Nrf2、HO-1、NQO-1 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Nrf2	HO-1	NQO-1
假手术	1.00	1.00	1.00
模型	2.13 ± 0.38*	2.45 ± 0.42*	2.38 ± 0.35*
Dex	2.86 ± 0.41* #	3.24 ± 0.53* #	3.35 ± 0.24* #
F 值	84.310	84.673	82.764
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与假手术组相比: * $P < 0.05$; 与模型组相比: # $P < 0.05$

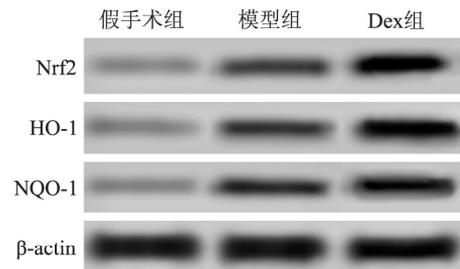


图3 Western blot 法检测脑组织 Nrf2、HO-1、NQO-1 蛋白

表5 脑组织 Nrf2、HO-1、NQO-1 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Nrf2	HO-1	NQO-1
假手术	0.36 ± 0.04	0.44 ± 0.08	0.47 ± 0.05
模型	0.59 ± 0.06*	0.62 ± 0.07*	0.61 ± 0.04*
Dex	0.94 ± 0.09* #	1.12 ± 0.10* #	0.98 ± 0.06* #
F 值	192.406	214.023	146.690
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

脑缺血一定时间后再灌注时,大量的氧自由基

一方面可引起细胞膜脂质过氧化、能量代谢障碍等导致神经细胞坏死,另一方面也可激活凋亡相关的信号通路,诱导神经细胞凋亡。Dex 是一种镇静剂,近年来研究^[8]显示,Dex 还可以激活神经系统及其他脏器的 $\alpha 2$ 受体或咪唑啉受体,保护神经、心脏、肾脏、肺等的功能。本研究中,Dex 后处理可以显著改善 CIRI 大鼠的神经功能和脑组织损伤,缩小其脑梗死面积。龚辉等^[9]的研究显示,Dex 可以减轻 CIRI 大鼠的炎症反应,抑制神经元细胞凋亡,保护 CIRI 大鼠的脑组织损伤,改善其神经功能,与本研究结果基本一致,提示 Dex 后处理可以改善 CIRI 大鼠的脑组织损伤和功能障碍,有望应用于临床治疗。

Nrf2/ARE 信号通路是机体内最重要的内源性抗氧化信号通路,在正常的生理状况下,Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 在细胞浆中相偶联,处于被抑制状态,一旦细胞受到氧自由基刺激时,前者可与后者发生解偶联,转位至细胞核,启动 ARE 调控的靶基因的表达^[10]。ARE 是一个 DNA-启动子结合序列,当活化的 Nrf2 转位至细胞核与其结合后,可激活下游多个抗氧化基因 HO-1、NQO-1、谷胱甘肽-S 转移酶等的表达,清除机体过多的氧自由基^[11]。本研究中,Dex 后处理可以显著上调 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的表达。HO-1 和 NQO-1 具有抗氧化、抗细胞凋亡、抗炎和维持微循环的功能,在机体抗氧化应激中具有重要作用^[12]。提示 Dex 后处理可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,发挥其抗氧化作用。本研究中,Dex 后处理还可以显著升高 SOD 活性,降低脑组织 MDA 和 NO 水平,提示 Dex 后处理可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,激活下游抗氧化基因 HO-1 和 NQO-1 的表达,清除机体过多的氧自由基,保护脑组织细胞免于损伤。

本研究中,Dex 后处理可以显著减少 CIRI 大鼠脑组织细胞的凋亡率,下调 Bax/Bcl-2 和 cleaved caspase-3/Bcl-2 的表达。临床研究^[13]显示,细胞凋亡在 CIRI 损伤中具有重要作用,是脑组织神经细胞死亡的主要原因。Bcl-2/Bax 蛋白是一组调节线粒体凋亡途径的重要蛋白,在凋亡信号刺激下,Bax 可与 Bcl-2 结合,破坏线粒体膜结构,导致细胞色素 C 释放,激活 caspase 反应,诱导细胞凋亡^[14]。兰琛^[15]的研究显示,Dex 干预可以上调凋亡基因 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 基因转膜,抑制细胞色素 C 的释放,抑制 caspase 相关的凋亡级联反应,从而抑制脑组织细胞的凋亡,保护脑组织免于损伤,与本研究结果基本一致,提示 Dex 后处理可能通过清除机体过

多的氧自由基,抑制脑组织细胞的凋亡,改善脑组织损伤。

综上所述,Dex 后处理可以促进 HO-1 和 NQO-1 的表达,清除机体过多的氧自由基,抑制脑组织细胞凋亡,改善 CIRI 大鼠脑组织细胞损伤和神经功能障碍,其作用机制可能与 Nrf2/ARE 信号通路的激活有关。但该研究仅初步探讨了 Dex 后处理可能的机制,其具体的作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Li Q, Ye T, Long T, et al. Ginkgetin exerts anti-inflammatory effects on cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in a rat model *via* the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(4): 675-83.
- [2] Lv E, Deng J, Yu Y, et al. Nrf2-ARE signals mediated the anti-oxidative action of electro-acupuncture in an MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(11): 1296-307.
- [3] Ding Y, Chen M, Wang M, et al. Posttreatment with 11-keto- β -boswellic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury: Nrf2/HO-1 pathway as a potential mechanism [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3): 1430-9.
- [4] Wang L, Liu H, Zhang L, et al. Neuroprotection of dexmedetomidine against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats: involved in inhibition of nf- κ b and inflammation response [J]. *Biomol Ther*, 2017, 25(4): 383-9.
- [5] 詹剑, 李琼, 郝仁方. 金钆石斛多糖对局灶性脑缺血-再灌注大鼠的作用 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2017, 14(1): 25-31.
- [6] 刘婷, 宋丹青, 张露勇, 等. 锌离子对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型中炎症反应的影响 [J]. *药学报*, 2016, 51(6): 892-7.
- [7] Liu C, Vojnovic D, Kochevar I E, et al. UV-A irradiation activates Nrf2-regulated antioxidant defense and induces p53/caspase3-dependent apoptosis in corneal endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4): 2319-27.
- [8] Vorobeichik L, Brull R, Abdallah F W. Evidence basis for using perineural dexmedetomidine to enhance the quality of brachial plexus nerve blocks: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Br J Anaesth*, 2017, 118(2): 167-81.
- [9] 龚辉, 张巧梅, 王强. 右美托咪定对大鼠脑缺血再灌注损伤后长期的神经保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(2): 138-42.
- [10] Dong F, Wang S, Wang Y, et al. Quercetin ameliorates learning and memory *via* the Nrf2-ARE signaling pathway in d-galactose-induced neurotoxicity in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(3): 636-41.
- [11] Staitieh B S, Ding L, Neveu W A, et al. HIV-1 decreases Nrf2/ARE activity and phagocytic function in alveolar macrophages [J].

- J Leukoc Biol ,2017 ,102(2) : 517 – 25.
- [12] Lv D , Zhou Q , Xia Y , et al. The association between oxidative stress alleviation *via* sulforaphane-induced Nrf2-HO-1/NQO-1 signaling pathway activation and chronic renal allograft dysfunction improvement[J]. *Kidney Blood Press Res* ,2018 ,43(1) : 191 – 205.
- [13] Zhang J F , Shi L L , Zhang L , et al. MicroRNA-25 negatively regulates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced cell apoptosis through FAS/FASL pathway[J]. *J Mol Neurosci* ,2016 ,58(4) : 507 – 16.
- [14] Renault T T , Dejean L M , Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2 [J]. *Mech Ageing Dev* ,2017 ,161(Pt B) : 201 – 10.
- [15] 兰 琛. 右美托咪定对大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响[J]. *山东医药* 2016 56(22) : 39 – 40.

Mechanism of dexmedetomidine in alleviating oxidative stress injury in cerebral ischemia-reperfusion rats

Qin Zhigang^{1 2} , Xu Younian³ , Li Kun⁴

¹Dept of Anesthesiology , Peking University Medical Zhuzhou Kaide Hospital , Zhuzhou 412000;

²Dept of Anesthesiology , Takkang Tongji(Wuhan) Hospital , Wuhan 430014;

³Dept of Anesthesiology , Wuhan Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College , Huazhong University of Science and Technology , Wuhan 430203;

⁴Dept of General Surgery , People's Hospital of Wuhan University , Wuhan 430060)

Abstract Objective To analyze the effect of dexmedetomidine(Dex) postprocessing in alleviating oxidative stress injury and nuclear factor erythroid 2 related factor 2(Nrf2) / antioxidant response element (ARE) signaling pathways in cerebral ischemia-reperfusion rats. **Methods** 30 SD rats were randomly divided into sham operation group , model group and Dex group , 10 cases in each group. The modified Longa method was referred to make middle cerebral artery occlusion model in model group and Dex group. The Dex group was intraperitoneally injected with 100 μ g/kg Dex(10 mg/L) at immediate reperfusion. After 24 h of reperfusion , The neurological defect score was performed. The cerebral infarction volume was detected by triphenyl tetrazolium chloride(TTC) method. The levels of superoxide dismutase(SOD) , malondialdehyde(MDA) and nitric oxide(NO) in brain tissues were determined by ELISA. RT-PCR and Western blot were performed to detect expression of B-cell lymphoma 2(Bcl-2) , Bcl-2 associated X protein(Bax) , cleaved caspase-3 , transcription factor E2 associated factor 2(Nrf2) , hemeoxygenase-1 (HO-1) and quinone oxidoreductase 1(NQO-1) . The brain tissues injury was detected by HE staining and TUNEL staining. **Results** Compared with sham operation group , neurological defect score , apoptosis rate , MDA and NO level in model group and Dex group increased($P < 0.05$) , while SOD activity in brain tissue decreased($P < 0.05$) , the expressions of Nrf2 , HO-1 , NQO-1 , cleaved Caspase-3/Bcl-2 and Bax/Bcl-2 were up-regulated($P < 0.05$) . Compared with model group , neurological defect score , cerebral infarction volume , apoptosis rate , MDA and NO level decreased in Dex group($P < 0.05$) , SOD activity in brain tissue increased($P < 0.05$) , and the expressions of Nrf2 , HO-1 and NQO-1 were up-regulated($P < 0.05$) , and the expressions of cleaved Caspase-3/Bcl-2 and Bax/Bcl-2 were down-regulated($P < 0.05$) . HE staining showed that pathological changes of brain tissues reduced. **Conclusion** Dex postprocessing can reduce the oxidative stress injury in CIRI rats , which may be related to the activation of Nrf2/ARE signaling pathway.

Key words cerebral ischemia-reperfusion; dexmedetomidine; oxidative stress