

# 右美托咪定对心肌缺血再灌注所致脑损伤的影响

吴科帆,张爱宁,季焯龙,张 艺,江 梦,夏中元

**摘要** **目的** 探讨右美托咪定对心肌缺血再灌注所致脑损伤中炎症因子及内质网应激的影响。**方法** SPF级健康雄性SD大鼠24只,体质量(200~220)g,(6~8)周龄,采用随机数字表法分为3组( $n=8$ ):假手术组(S组)、心肌缺血再灌注组(IR组)、心肌缺血再灌注+右美托咪定组(IR+Dex组)。大鼠适应饲养环境后,采用结扎左冠状动脉前降支30min后再灌注120min的方法建立心肌缺血再灌注损伤模型。于再灌注开始时给予IR+Dex组25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 右美托咪定,S组和IR组注射等容量0.9%氯化钠溶液。断头处死大鼠取脑组织,光镜下观察大鼠海马HE染色的细胞结构变化。ELISA法检测血清炎症因子IL-6、IL-8、IL-10。Western blot法测定大鼠海马组织中CCAAT-增强子结合蛋白同源蛋白(Chop)、免疫球蛋白结合蛋白(Bip)、真核生物起始因子2(eif-2 $\alpha$ )和蛋白激酶RNA样内质网激酶PERK(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase,PERK)的表达水平。**结果** 与S组比较,IR组和IR+Dex组脑组织病理损伤加重,血清炎症因子IL-6、IL-8表达增加( $P<0.05$ ),IL-10表达减少( $P<0.05$ ),海马组织中Chop、Bip、磷酸化真核生物起始因子2(p-eif-2 $\alpha$ )和磷酸化蛋白激酶RNA样内质网激酶(p-perk)蛋白表达上调( $P<0.05$ );与IR组比较,IR+Dex组脑组织病理损伤减轻,IL-6、IL-8表达下调( $P<0.05$ ),IL-10表达增加( $P<0.05$ ),海马组织中Chop、Bip、p-eif-2 $\alpha$ 和p-perk的表达下调( $P<0.05$ )。**结论** 右美托咪定预处理可减轻心肌缺血再灌注所致的脑损伤,其机制可能与抑制全身炎症反应和内质网应激有关。

**关键词** 右美托咪定;脑损伤;心肌缺血再灌注;内质网应激;炎症因子

**中图分类号** R 614.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0265-04  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.019

心肌缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)是治疗心肌梗死的主要方法,同时也是加重心肌损伤的机制之一。虽然它可以提供心肌有氧代谢所必需的氧气和营养物质,但血流的重建和恢复可以对心肌

产生更严重的打击,称为缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明IRI可导致细胞内离子堆积、线粒体膜损伤、活性氧形成、一氧化氮代谢紊乱、内皮功能障碍、血小板聚集、免疫激活、细胞凋亡和自噬等多种病理生理过程。大脑作为人体生命中枢器官,虽有血脑屏障的保护,仍易由于体内血液再分布而遭受侵袭,导致IRI后的继发性脑损伤<sup>[3]</sup>。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)是一种高选择性的 $\alpha_2$ -肾上腺素能受体激动剂,对心脏、肾脏等器官的缺血再灌注损伤有保护作用。已有研究<sup>[4-6]</sup>证实Dex可通过抑制内质网应激和炎症反应等途径减轻糖尿病大鼠脑损伤。该研究拟观察右美托咪定预处理对心肌缺血再灌注所致脑损伤的影响,并探究其与全身炎症反应及内质网应激的关系。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料与仪器** SD大鼠购自北京维通利华实验技术有限公司。右美托咪定购自江苏恒瑞医药股份有限公司(批号:14030332)。CCAAT-增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT-enhancer-bindingprotein homologous protein, Chop)、免疫球蛋白结合蛋白(binding immunoglobulin protein, Bip)一抗购自美国Abcam公司,磷酸化真核生物起始因子2(phosphorylated- $\alpha$ subunit of eukaryotic initiation factor 2, p-eif-2 $\alpha$ )、磷酸化蛋白激酶RNA样内质网激酶(phosphorylated protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, p-perk)一抗购自美国CST公司,荧光二抗购自美国LI-COR公司。DW-2000型小动物呼吸机购自上海嘉鹏科技有限公司, BX50型光学显微镜购自日本Olympus公司, ELISA试剂盒购自南京建成生物工程研究所, Odyssey 双色红外激光扫描显影仪购自美国LI-COR公司。

**1.2 实验分组与处理** SPF级健康雄性SD大鼠24只,体质量200~220g,6~8周龄,采用随机数字表法分为3组,每组8只:假手术组(S组)、心肌缺血再灌注组(IR组)、心肌缺血再灌注+右美托咪定组(IR+Dex组)。于标准SPF级环境进行适应性

2021-10-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81801309)

作者单位:武汉大学人民医院麻醉科,武汉 430060

作者简介:吴科帆,男,硕士研究生;

夏中元,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: xiazhongyuan2005@aliyun.com

饲养 1 周,术前禁食 12 h。大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠进行麻醉并固定,同时进行心电监测。S 组只穿线,不结扎 LAD。IR + DEX 组于再灌注开始时给予 IR + Dex 组静脉注射右美托咪定 25 μg/kg, S 组和 IR 组静脉注射等容量 0.9% 氯化钠溶液。将大鼠气管切开行气管插管术,连接小动物呼吸机进行机械通气。开胸暴露大鼠心脏,用 7-0 带线缝针结扎冠状动脉左前降支(LAD)30 min,肉眼观察心尖部变白,室壁运动减弱,同时心电监测出现明显 ST 段背向上抬高,认为心肌缺血再灌注模型造模成功。松开线结可见心电图 ST 段回落,心尖部恢复红润,表明再灌注成功,再灌注 120 min 后即刻经颈动脉采集血样,断头处死大鼠取脑组织。

1.3 观察指标以及检测方法

1.3.1 HE 染色观察大鼠脑组织病理结果 再灌注 120 min 后取脑组织,石蜡包埋后于切片机上切片,置于 4% 多聚甲醛液固定 24 h,HE 染色后于光镜下观察病理结果。

1.3.2 ELISA 法检测血清炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10 再灌注 120 min 后即刻经颈动脉采集血样,于 4℃ 下 2 000 r/min 离心 15 min,离心半径 8.6 cm,取上清液,使用 ELISA 试剂盒测定血清 IL-6、IL-8 和 IL-10 水平,操作过程严格按照试剂盒说明进行。

1.3.3 Western blot 法测定大鼠海马组织中 Chop、Bip、p-eif-2α 和 p-perk 的表达水平 取大鼠海马组织,置于冰上加入 RIPA 裂解液裂解 30 min,冰浴电动匀浆,4℃ 下 12 000 r/min 离心 20 min,离心半径 8.6 cm,取上清液于 -20℃ 冻存。采用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 × 上样缓冲液并混匀煮沸 10 min,行 PAGE 凝胶电泳,后转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h;加入 Chop 一抗(稀释度 1:1 000)、Bip 一抗(稀释度 1:1 000)、p-eif-2α 一抗(稀释度 1:1 000)和 p-perk 一抗(稀释度 1:1 000),4℃ 下摇床孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,10 min/次,加入荧光二抗(稀释度 1:10 000)室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次,10 min/次。红外成像显影仪扫描分析荧光蛋白条带,测定各目的蛋白条带灰度值。用 GAPDH 作为内参,以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析,正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌缺血再灌注后脑组织病理切片观察 光镜下, S 组可见神经元清晰排列,胞质丰富,核圆形,碱染呈蓝色,结构较为清晰,未见明显异常。IR 组神经元病理损伤较重,形态不规则,胞质分布不均,有空泡,核固缩、溶解或消失,细胞结构被破坏,核染色不均匀,呈淡红色。IR + Dex 组中,神经元损伤减轻,大多数胞膜完整,核仁清晰可见。见图 1。

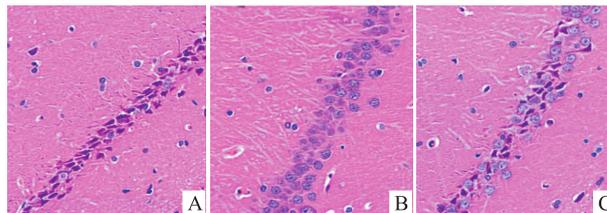


图 1 三组大鼠海马组织病理学结果 HE ×40  
A: S 组; B: IR 组; C: IR + Dex 组

2.2 ELISA 检测心肌缺血再灌注后血清炎症因子 与 S 组比较, IR 组和 IR + Dex 组血清炎症因子 IL-6、IL-8 表达均增加 ( $P < 0.05$ ), IL-10 的表达减少 ( $P < 0.05$ )。与 IR 组比较, IR + Dex 组 IL-6、IL-8 表达有所下调 ( $P < 0.05$ ), 而 IL-10 的表达增加 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 3 组大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-8 和 IL-10 水平的比较 (ng/L,  $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6	IL-8	IL-10
S	1.00	1.00	1.00
IR	8.72 ± 0.63 *	10.05 ± 0.56 *	0.51 ± 0.12 *
IR + Dex	4.63 ± 0.34 *#	6.84 ± 0.45 *#	1.15 ± 0.23 *#

与 S 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 IR 组比较: #  $P < 0.05$

2.3 心肌缺血再灌注后大鼠海马组织中 Chop、Bip、p-eif-2α 和 p-perk 的表达 与 S 组比较, IR 组和 IR + Dex 组大鼠海马组织中 Chop、Bip、p-eif-2α 和 p-perk 蛋白表达水平均上调 ( $P < 0.05$ )。与 IR 组比较, 进行了右美托咪定预处理后的心肌缺血再灌注后的大鼠海马组织中 Chop、Bip、p-eif-2α 和 p-perk 的表达有所下调 ( $P < 0.05$ )。见表 2、图 2。

3 讨论

该研究参照文献<sup>[7]</sup>制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型, 即于气管插管后结扎 LAD 30 min, 解除

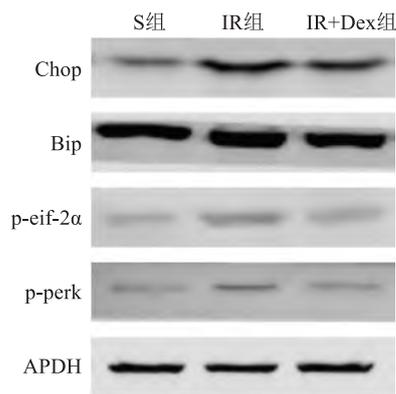


图2 3组大鼠海马组织 Chop、Bip、p-eif-2 $\alpha$  和 p-perk 的 Western blot 表达条带

表2 3组大鼠海马组织中 Chop、Bip、p-eif-2 $\alpha$  和 p-perk/GADPH 表达的比较 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	Chop	Bip	p-eif-2 $\alpha$	p-perk
S	0.427 $\pm$ 0.077	1.878 $\pm$ 0.144	0.170 $\pm$ 0.033	0.229 $\pm$ 0.008
IR	1.273 $\pm$ 0.103 *	2.396 $\pm$ 0.173 *	0.513 $\pm$ 0.038 *	0.463 $\pm$ 0.035 *
IR + Dex	0.707 $\pm$ 0.093 **	2.150 $\pm$ 0.165 **	0.206 $\pm$ 0.017 **	0.293 $\pm$ 0.017 **

与 S 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 IR 组比较: #  $P < 0.05$

结扎后再灌注 120 min。结果显示,与 S 组比较,IR 组大鼠脑组织中神经元出现病理损伤,细胞结构遭到破坏,提示心肌缺血再灌注诱发了大鼠脑损伤。该研究参照文献<sup>[8]</sup>于再灌注开始时给予 IR + Dex 组 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  右美托咪定,S 组和 IR 组注射等容量 0.9% 氯化钠溶液。结果显示,与 IR 组比较,IR + Dex 组脑组织病理学损伤减轻,细胞镜下无明显损伤,提示右美托咪定预处理减轻了心肌缺血再灌注所致的大鼠脑损伤。

再灌注引发的炎症反应是心肌再灌注缺血损伤的重要环节。在炎症应答机制中,许多细胞因子如 IL-6、IL-8 等被释放<sup>[9]</sup>,而抗炎因子 IL-10 被大量消耗<sup>[10]</sup>。ELISA 结果显示,与 S 组比较,IR 组和 IR + Dex 组 IL-6、IL-8 表达增加,IL-10 表达减少;与 IR 组比较,IR + Dex 组 IL-6、IL-8 表达下调,而 IL-10 表达增加。提示心肌缺血再灌注引发的炎症反应使血液中炎性介质通过机体内的血液再分布进入脑组织并导致相应损伤,而右美托咪定预处理可通过抑制全身炎症反应减轻脑组织损伤。

内质网应激是指细胞内质网内稳态失衡导致细胞生理功能发生改变的一种病理反应,是由于各种病理和生理事件导致未折叠或错误折叠的蛋白质的积累加速的状态<sup>[11]</sup>。蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 PERK 是位于内质网膜上的一种 I 型跨膜蛋白,属于真核生物起始因子 2 上游激酶家族中的一种。内

质网应激早期,通过 Bip 免疫球蛋白结合蛋白 Bip 在上游激活 PERK 信号通路抑制蛋白质的合成,对细胞起保护作用、促进细胞生存。随着内质网应激时间的延长,PERK 通过诱导 Chop 的表达而促进细胞凋亡。PERK 信号途径在中枢神经系统损伤、缺血再灌注损伤及代谢异常等病理过程中发挥着重要的作用<sup>[12-13]</sup>。内质网应激作为介导脑缺血众多反应的复杂机制,与缺血后神经元细胞死亡有关<sup>[14]</sup>。心肌发生缺血再灌注时,心肌的缺血低氧继发了脑组织的缺血低氧,神经元出现能量代谢障碍诱发内质网应激,再灌注后脑组织血流恢复,血液中产生的各种离子、介质加重内质网应激<sup>[15]</sup>。Western blot 结果显示,与 S 组比较,IR 组和 IR + Dex 组大鼠海马组织中 Chop、Bip、p-eif-2 $\alpha$  和 p-perk 蛋白表达上调;与 IR 组比较,IR + Dex 组海马组织中 Chop、Bip、p-eif-2 $\alpha$  和 p-perk 的表达下调,提示右美托咪定预处理可能通过抑制内质网应激减轻大鼠心肌缺血再灌注所致脑损伤。

综上所述,右美托咪定预处理可减轻心肌缺血再灌注所致的脑损伤,其机制可能与减轻全身炎症反应、抑制内质网应激有关。

#### 参考文献

- [1] Gunata M, Parlakpınar H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment [J]. Cell Biochem Funct, 2021, 39(2): 190-217.
- [2] Mao Z J, Lin H, Xiao F Y, et al. Melatonin against myocardial ischemia-reperfusion injury: a meta-analysis and mechanism insight from animal studies [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1241065.
- [3] 赵博, 高文蔚, 侯家保, 等. 缺血后处理减轻心肌缺血再灌注引起的脑损伤的机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(11): 2352-4.
- [4] Zhang J J, Peng K, Zhang J, et al. Dexmedetomidine preconditioning may attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury by down-regulating the HMGB1-TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0172006.
- [5] Kiliç K, Hancı V, Selek S, et al. The effects of dexmedetomidine on mesenteric arterial occlusion-associated gut ischemia and reperfusion-induced gut and kidney injury in rabbits [J]. J Surg Res, 2012, 178(1): 223-32.
- [6] 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): e0151620.
- [7] Xue R, Lei S, Xia Z Y, et al. Selective inhibition of PTEN preserves ischaemic post-conditioning cardioprotection in STZ-in-

- duced type 1 diabetic rats; role of the PI3K/Akt and JAK2/STAT3 pathways[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(5): 377 - 92.
- [8] Bao N, Tang B, Wang J. Dexmedetomidine preconditioning protects rats from renal ischemia-reperfusion injury accompanied with biphasic changes of nuclear factor-Kappa B signaling[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 3230490.
- [9] Zhao C, Yang Y, An Y, et al. Cardioprotective role of phyllanthin against myocardial ischemia-reperfusion injury by alleviating oxidative stress and inflammation with increased adenosine triphosphate levels in the mice model[J]. *Environ Toxicol*, 2020, 36(1), 33 - 44.
- [10] Tang T T, Wang B, Wu M, et al. Extracellular vesicle-encapsulated IL-10 as novel nanotherapeutics against ischemic AKI[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(33): eaaz0748.
- [11] 孔文文,张 昕.内质网应激和蛋白质羧基化在心力衰竭恶病质中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 244 - 8.
- [12] Da Silva D C, Valentão P, Andrade P B, et al. Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer and neurodegenerative disorders: tools and strategies to understand its complexity[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104702.
- [13] Siwecka N, Rozpędek W, Pytel D, et al. Dual role of endoplasmic reticulum stress-mediated unfolded protein response signaling pathway in carcinogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4354.
- [14] Hadley G, Neuhaus A A, Couch Y, et al. The role of the endoplasmic reticulum stress response following cerebral ischemia[J]. *Int J Stroke*, 2018, 13(4): 379 - 90.
- [15] Su Y, Li F. Endoplasmic reticulum stress in brain ischemia[J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(8): 681 - 91.

## Effects of dexmedetomidine on brain injury induced by myocardial ischemia reperfusion

Wu Kefan, Zhang Aining, Ji Yelong, Zhang Yi, Jiang Meng, Xia Zhongyuan  
(Dept of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060)

**Abstract Objective** To investigate the effects of dexmedetomidine on inflammatory factors and endoplasmic reticulum stress in myocardial ischemia reperfusion induced brain injury. **Methods** Twenty-four SPF-grade healthy male SD rats, weighing (200 ~ 220)g and aged (6 ~ 8) weeks, were divided into three groups ( $n = 8$ ) by random number table method: sham operation group (S group), myocardial ischemia reperfusion group (IR group) and myocardial ischemia/reperfusion + Dex group (IR + Dex group). After the rats were adapted to the feeding environment, the myocardial ischemia reperfusion injury model was established by ligating the anterior descending branch of the left coronary artery for 30 min and reperfusion for 120 min. At the beginning of reperfusion, IR + Dex group was given 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dexmedetomidine, S group and IR group were injected with equal volume normal saline. Rats were sacrificed by decapitation and brain tissue was taken and the changes of hippocampal cell structure of rats stained by HE were observed under light microscope. Serum inflammatory factors IL-6, IL-8 and IL-10 were detected by ELISA. The expressions of Chop, Bip, p-eif-2 $\alpha$  and p-perk in rat hippocampal tissues were determined by Western blot. **Results** Compared with the S group, the IR group and the IR + Dex group showed aggravation of brain lesions, increased expression of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 ( $P < 0.05$ ), and decreased expression of IL-10 ( $P < 0.05$ ). Hippocampal Chop, Bip, p-eif-2 $\alpha$  and p-perk proteins were up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with IR group, IR + Dex group showed reduced pathological injury, decreased expression of IL-6 and IL-8 ( $P < 0.05$ ), increased expression of IL-10 ( $P < 0.05$ ), and down-regulated expressions of Chop, Bip, p-eif-2 $\alpha$  and p-perk in hippocampal tissues ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Dexmedetomidine preconditioning can reduce the brain injury caused by myocardial ischemia reperfusion, and its mechanism may be related to the inhibition of systemic inflammatory response and endoplasmic reticulum stress.

**Key words** dexmedetomidine; brain injury; myocardial ischemia reperfusion; endoplasmic reticulum stress; inflammatory factors