

· 实验研究 ·

不同剂量右美托咪定对创伤性脑损伤小鼠急性期脑水肿的影响

张娜娜 程世翔 衣泰龙 黄红洁 张赛 杨程

【摘要】目的 探讨不同剂量右美托咪定对创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)小鼠急性期脑水肿的影响。**方法** 健康成年雄性 C57BL/6J 小鼠 132 只,随机分为六组:正常对照组(C组)、假手术组(Sham 组)、创伤性脑损伤组(TBI 组)、右美托咪定 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D20 组)、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D40 组)、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D60 组),每组 22 只。应用电子控制性脑皮质撞击仪(eCCD)建立 TBI 小鼠模型,即刻经腹腔注射不同剂量右美托咪定(20、40、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$),每隔 2 小时给药 1 次,共 3 次。伤后 24 h 分别采用干/湿重法测定脑含水量,HE 染色法观察损伤侧皮质细胞形态变化,Western blot 法检测损伤侧脑组织中水通道蛋白 4(AQP4)和核转录因子 κB (NF- κB)的蛋白含量。并于伤后第 1、2、3、7 天采用改良神经功能缺陷评分(mNSS)评价其神经功能受损程度,伤后第 4、5、6、7 天应用 Morris 水迷宫实验观察其行为学改变。**结果** 与 Sham 组比较,TBI 组不同时点 mNSS 评分明显升高,逃避潜伏期明显延长,脑含水量明显升高,损伤侧皮质损伤严重,AQP4 和 NF- κB 蛋白含量明显升高($P < 0.01$)。与 TBI 组比较,右美托咪定各剂量组 mNSS 评分明显降低,逃避潜伏期明显缩短,脑含水量明显降低,损伤侧皮质细胞空泡变性和炎症反应有所改善,AQP4 和 NF- κB 蛋白含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);D60 组上述指标改变较 D20 组更为明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 右美托咪定 20~60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 可以减轻 TBI 后急性脑水肿和认知功能障碍,随着剂量的增高,此作用更为明显,这可能与降低 TBI 后 AQP4 和 NF- κB 表达密切相关。

【关键词】 右美托咪定;创伤性脑损伤;脑水肿;水通道蛋白 4;核因子- κB

Effects of different doses of dexmedetomidine on acute brain edema in mice with traumatic brain injury

ZHANG Nana, CHENG Shixiang, YI Tailong, HUANG Hongjie, ZHANG Sai, YANG Cheng.
Tianjin Key Laboratory of Neurotraum Repair, Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Corresponding author: YANG Cheng, Email: poweryc@126.com

【Abstract】Objective To explore the effects of different doses of dexmedetomidine on acute brain edema in mice with traumatic brain injury (TBI). **Methods** A total of 132 male C57BL/6J mice were randomly divided into six groups: control group (group C), sham-operation group (group Sham), traumatic brain injury group (group TBI), Dex 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (group D20), 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (group D40), and 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (group D60), $n=22$ in each group. The TBI animal model was established by electric controlled cortical impactor (eCCD), then intraperitoneal injected by the administration of different doses of dexmedetomidine at 0, 2 and 4 h after TBI. Twenty-four hours post-TBI, brain water content was measured by the dry-wet method, histological observation was performed using HE staining, and aquaporin 4 (AQP4) and NF- κB expression were detected using Western blot assay, respectively. Then, the modified neurological scale scores (mNSS) on 1, 2, 3, and 7 d and Morris water maze (MWM) test on 4, 5, 6 and 7 d post-TBI were used to evaluate the neurologic deficit of TBI mice. **Results** After traumatic brain injury, the mNSS scores, the escape latency, the brain water content and the expression of AQP4 and NF- κB increased significantly in group TBI ($P < 0.01$). Different doses of dexmedetomidine significantly reduced the mNSS scores, the escape latency, the brain water content and the expression of AQP4 and NF- κB ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). And meanwhile dexmedetomidine can lessen neuronal degeneration, and inflammation response. Additionally, the effect was remarkably in group D60 compared with group D20 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Dexmedetomidine can lessen brain edema and cognition impairment induced with trau-

基金项目:国家自然科学基金(31200809);天津市临床医学研究中心科技重大专项(15ZXLCYSY00040);天津市重点实验室开放基金(WYKFZ201601);武警后勤学院附属医院种子基金(FYZ201505)

作者单位:300162 天津市神经创伤修复重点实验室 武警后勤学院附属医院脑科中心

通信作者:杨程,Email:poweryc@126.com

matic brain injury, which is a dose-effect relationship within 20-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and this effect may be related to the downregulation of AQP4 and NF- κB expression.

【Key words】 Dexmedetomidine; Traumatic brain injury; Brain edema; Aquaporin 4; Nuclear factor-kappa B

临床上,因创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)而就诊的患者逐年增多,且愈后较差,而创伤性脑水肿是其中一个重要的因素。有研究证实大约 50% 的 TBI 患者因脑水肿而死亡^[1],脑水肿发生与否和严重程度也可以作为评价预后的重要指标^[2]。因此,如何缓解脑水肿的发生是治疗 TBI 的关键环节之一。

右美托咪定(dexmedetomidine)是一种高选择性的 α_2 肾上腺受体激动药,目前主要用于临床麻醉管理和重症监测治疗^[3]。有研究表明,右美托咪定在脑缺血-再灌注模型中具有一定的脑保护作用^[4-6],同时可减轻脑水肿,有效预防中枢神经损伤^[7]。然而,对于创伤性脑损伤小鼠模型,不同剂量右美托咪定是否可减轻其急性期脑水肿,仍未见相关研究。本实验采用电子控制性脑皮质撞击仪(eCCI)建立 TBI 小鼠模型,观察不同剂量右美托咪定对 TBI 的神经保护作用,对其在 TBI 后脑水肿中的作用机制进行初步探讨。

材料与方 法

材料与试剂 右美托咪定(批号:20130404);鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(货号:ab8245),兔抗 AQP4 单克隆抗体(货号:ab46182),兔抗 NF- κB 单克隆抗体(货号:ab16502);电子控制性脑皮质撞击仪(eCCI 6.3);Morris 水迷宫测试系统;Amersham Imager 600 显色仪。

实验动物及分组 清洁级健康成年雄性 C57BL/6J 小鼠 132 只,7~8 周龄,体重 20~25 g,由北京华阜康实验动物有限责任公司供应[合格证号 SCXX(京)2014-0004]。随机将小鼠分为六组:对照组(C 组)、假手术组(Sham 组)、创伤性脑损伤组(TBI 组)、右美托咪定 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D20 组)、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D40 组)、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D60 组),每组 22 只。

TBI 动物模型建立和药物处理 实验前对实验小鼠给予禁食 12 h、不禁水处理。腹腔注射 5% 水合氯醛 7 ml/kg 麻醉后,取俯卧位置于立体定向架。消毒后于中线处切开头皮,剥离骨膜,暴露右顶骨,在右侧冠状缝和人字缝之间、中线旁处,使用颅骨钻开直径为 3 mm 圆形骨窗,暴露完整硬脑膜。设

定电子控制性脑皮质撞击仪(eCCI)参数,打击臂与垂直方向角度为 20°,参数设定为打击深度 1 mm、打击速率 5 m/s、持续时间 120 ms,使用直径 3 mm 打击帽精确撞击小鼠右侧脑皮质。右美托咪定各剂量组在 TBI 模型建立后即刻分别经腹腔注射右美托咪定 20、40、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$,之后每间隔 2 小时给药 1 次,共 3 次。C 组不做任何处理,正常饲养。Sham 组小鼠开骨窗但不行打击,并在同一时间给予等量生理盐水。

改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS) 按照盲法原则,由对实验分组情况不了解、经过专业培训的研究人员,采用 mNSS 评价实验小鼠 TBI 后第 1、2、3、7 天的运动、感觉、提尾、平衡和反射等行为学损害程度。总分最低为 0 分,提示小鼠完全正常,没有神经功能缺损;最高为 18 分,提示小鼠意识丧失或死亡。

逃避潜伏期测定 实验小鼠于 TBI 前 4 d 进行训练(4 次/天),从不同象限将小鼠面向池壁放入水中,寻找水中隐藏平台(平台位于第一象限,没于水面下 1 cm),记录所用时间为逃避潜伏期。超过 60 s(即 60 s 内未找到平台)则潜伏期记为 60 s,随后引导小鼠至平台,停留 2 s,放回笼中待下一次训练。训练 4 d 后筛选出找到平台时间无差异的小鼠进入实验分组。于 TBI 后第 4、5、6、7 天分别检测逃避潜伏期。

脑含水量测定 采用干/湿重法测定脑组织含水量。实验小鼠于 TBI 24 h 后在深麻醉状态下断头取脑,弃去小脑和双侧嗅球,用滤纸吸干表面水分,沿正中线将脑组织分为损伤侧和非损伤侧,分别称其湿重,再将两部分脑组织置于 65°C 恒温箱中 48 h,烘干称取各自干重,按公式:脑含水量=(湿重-干重)/湿重 \times 100%,分别计算出各组两侧的脑含水量。

损伤侧皮质水肿检测 实验小鼠于 TBI 24 h 后在深麻醉状态下开胸,生理盐水灌注心脏,用 4% 多聚甲醛 30 ml 灌注固定,断头取脑置于多聚甲醛中固定过夜,常规脱水,石蜡包埋,切成 4 μm 薄片,烘烤染色,在显微镜下观察皮质部位的水肿情况。

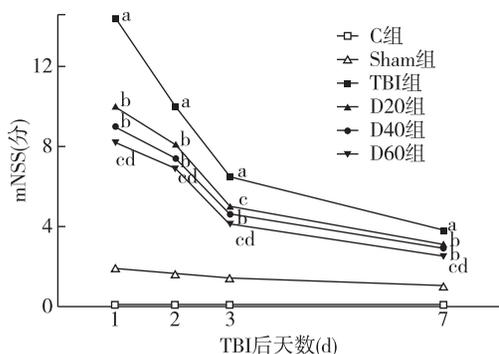
脑组织水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4)和核转录因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF- κB)蛋

白含量检测 实验小鼠于 TBI 24 h 后在深麻醉状态下,心脏灌注取脑组织,切碎,加入组织裂解液用超声破碎仪破碎 20 min,超速离心后采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白加入热变性后,按 60 μg 蛋白上样量上样,在 SDS-PAGE 凝胶系统中电泳,转膜,在常温下用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入 AQP4 和 NF-κB 一抗(1:1 000 稀释)4℃孵育过夜, TBST 液洗膜后用二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 1 h。使用 Amersham Imager 600 显色成像,并应用 Scion Image 图像分析系统对目的蛋白进行灰度值分析。

统计分析 采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)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。

结 果

神经行为学变化 小鼠 TBI 后神经功能严重受损,表现为平衡功能障碍,不能沿直线行走,甚至向对侧倾倒,各深感觉障碍,饮食摄水减少,其中伤后第 1 天最严重,之后症状逐渐缓解,至伤后第 7 天行为功能可基本接近正常水平。TBI 组各时点 mNSS 均明显高于 Sham 组($P < 0.01$);右美托咪定各剂量组不同时点 mNSS 均明显低于 TBI 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);D60 组各时点 mNSS 均明显低于 D20 组($P < 0.01$);C 组与 Sham 组差异无统计学意义(图 1)。

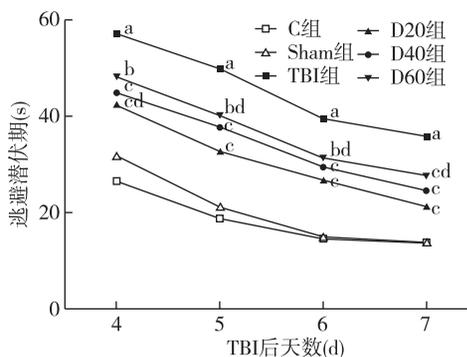


注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 TBI 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与 D20 组比较,^d $P < 0.01$

图 1 六组小鼠不同时点 mNSS 的比较

逃避潜伏期 TBI 后第 4 天其余各组小鼠逃避潜伏期明显长于 Sham 组($P < 0.01$);右美托咪定各剂量组不同时点逃避潜伏期均明显短于 TBI 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);D60 组各时点逃避潜伏期

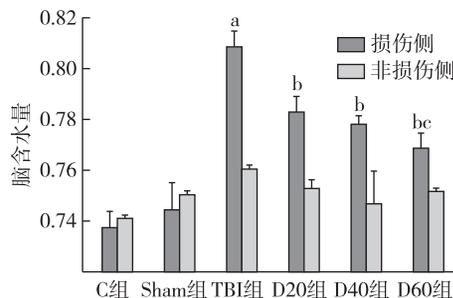
均明显短于 D20 组($P < 0.05$);C 组与 Sham 组差异无统计学意义(图 2)。



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 TBI 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与 D20 组比较,^d $P < 0.05$

图 2 六组小鼠不同时点逃避潜伏期的比较

脑组织含水量 TBI 组损伤侧脑含水量明显高于 Sham 组($P < 0.01$);右美托咪定各剂量组脑含水量明显低于 TBI 组($P < 0.01$);D60 组脑含水量明显低于 D20 组($P < 0.01$);C 组与 Sham 组差异无统计学意义。非损伤侧各组脑含水量差异无统计学意义(图 3)。



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 TBI 组比较,^b $P < 0.01$;与 D20 组比较,^c $P < 0.01$

图 3 六组小鼠损伤侧和非损伤侧脑含水量的比较

脑皮质水肿和炎症情况 C 组和 Sham 组脑皮质区细胞形态结构正常,排列整齐。TBI 组皮质区有大量出血灶,大量炎性细胞浸润,细胞核固缩或消失,甚至出现细胞的变性坏死。右美托咪定干预后皮质区病变减轻,空泡样变性明显好转,出血灶明显减少,其中以 D60 组改善最为明显(图 4)。

脑组织中 AQP4 和 NF-κB 蛋白含量 TBI 组损伤侧脑组织 AQP4 和 NF-κB 蛋白含量明显高于 Sham 组($P < 0.01$);右美托咪定各剂量组中 AQP4、NF-κB 蛋白含量均明显低于 TBI 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),D60 组 AQP4 和 NF-κB 蛋白含

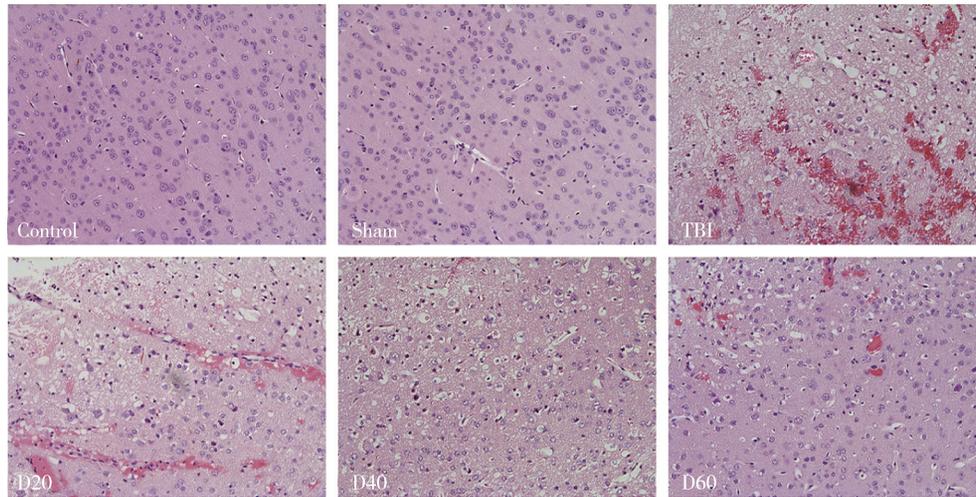


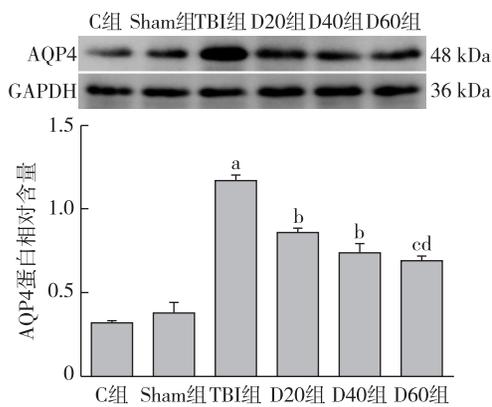
图 4 六组小鼠脑组织皮质区病理变化(HE, ×200)

量明显低于 D20 组 ($P < 0.01$); C 组与 Sham 组差异无统计学意义(图 5,6)。

讨 论

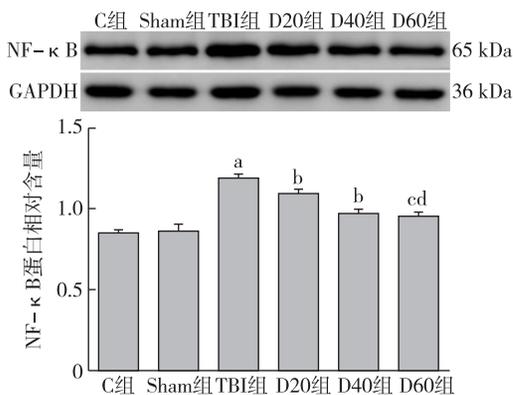
创伤性脑水肿是水分子在脑细胞及细胞间隙之间大量累积的结果,导致脑体积增大,是 TBI 患者最严重的并发症之一^[8]。创伤性脑水肿分为细胞毒性、血管源性、间质性和渗透性,其中,细胞毒性脑水肿是因神经细胞受机械性损伤,造成大量 Ca^{2+} 内流、 K^+ 外流,导致细胞肿胀,主要与创伤后脑组织的缺血缺氧有关;而血管源性脑水肿是由于 TBI 后血脑屏障内皮细胞连接障碍,使血管内皮细胞通透性增加引起的水肿,主要与脑挫伤有关。几种脑水肿共同作用,最终导致颅内压急剧升高,甚至发生脑疝,这是 TBI 后发生伤残的主要危险因素之一^[9]。因此,寻找有效的药物并探究其合适的浓度来防控脑水肿,可以更好地降低 TBI 患者死亡率,提高其预后的生存质量。

右美托咪定是高度选择性的 α_2 肾上腺受体激动药,因其具有镇静、镇痛、抗焦虑而无呼吸抑制的特性,目前广泛用于临床麻醉辅助及重症治疗,尤其是重症监护室里需要维持镇静的 TBI。右美托咪定主要作用机制可能是使机体处于“休眠”状态,控制 TBI 等急性损伤导致的病理过程,进而抑制脑水肿的发生^[10]。在脑水肿病理进程中, AQP4 作为一种水通道蛋白,其上调表达与细胞毒性脑水肿密切相关^[11];而 NF- κ B 是介导炎症反应的重要中间蛋白,可调节促炎蛋白基因的表达^[12]。本实验结果显示, TBI 小鼠脑组织中 AQP4 和 NF- κ B 表达明显升高,而给予不同剂量右美托咪定处理后二者的表达均有下调,提示右美托咪定可能是通过降低



注:与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$;与 TBI 组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$;与 D20 组比较, ^c $P < 0.01$

图 5 六组小鼠脑组织中 AQP4 蛋白相对含量的比较



注:与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$;与 TBI 组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$;与 D20 组比较, ^c $P < 0.01$

图 6 六组小鼠脑组织中 NF- κ B 蛋白相对含量的比较

AQP4、NF- κ B 表达,减轻脑水肿和抑制炎症反应,从而发挥神经保护作用。而最近的一项研究表明右美托咪定可以通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路的表达对脑缺血-再灌注大鼠产生脑保护作用^[13],本研究结果与其一致。

右美托咪定结构中存在咪唑环,可与咪唑类受体结合,后者通常位于线粒体外膜,与右美托咪定结合后可减少组织释放大鼠肾上腺素,从而在脑缺血中发挥记忆保护作用^[14]。本实验结果表明,给予不同剂量右美托咪定后 TBI 小鼠神经功能缺陷评分明显降低,逃避潜伏期也有明显改善,而且右美托咪定 60 μ g/kg 改善效果尤为明显,这提示在一定剂量范围内,神经保护作用随右美托咪定浓度的增加而加强,其机制可能是右美托咪定作用于脑组织海马处 α_2 肾上腺素受体和咪唑类受体,改善 TBI 动物的学习记忆能力并通过增加 TBI 小鼠的镇静程度,降低其脑组织代谢率和急性炎症反应,从而降低脑耗氧量及 TBI 后的炎症反应,减轻脑水肿程度。

本实验的目的是观察不同剂量右美托咪定的干预是否对创伤性脑损伤小鼠急性期脑水肿有保护作用。右美托咪定临床使用剂量为 1 μ g/kg,小鼠使用剂量为临床使用剂量的 10 倍左右。之前的预试验结果表明:右美托咪定 5、10 μ g/kg 对创伤性脑损伤小鼠急性期脑水肿没有保护作用,而 15 μ g/kg 则有一定的保护作用。考虑到右美托咪定有致心动过缓的作用,可能出现增加实验小鼠死亡率的情况,因此本实验仅仅选择 20、40、60 μ g/kg 作为实验梯度,至于更精确的范围,是下一步研究的重点。

综上所述,右美托咪定可明显减轻 TBI 后急性脑水肿和认知功能障碍,而且在 20~60 μ g/kg 剂量范围内,这种保护作用呈现浓度依赖性,其机制可能是通过降低 AQP4 和 NF- κ B 表达而发挥神经保护作用。

参 考 文 献

[1] Donkin JJ, Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol*, 2010, 23(3): 293-299.

- [2] Gatto R, Chauhan M, Chauhan N. Anti-edema effects of rhEpo in experimental traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci*, 2015, 33(6): 927-941.
- [3] 朱睿瑶, 冯丽芝, 张迪, 等. 丙泊酚与右美托咪啶用于 ICU 中颅脑外伤患者镇静效果观察. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(14): 1563-1565.
- [4] Kim E, Kim HC, Lee S, et al. Dexmedetomidine confers neuroprotection against transient global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting inflammation through inactivation of the TLR-4/NF- κ B pathway. *Neurosci Lett*, 2017, 649(4): 20-27.
- [5] 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. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016, 54(3): 377-382.
- [6] 程江霞, 彭晓红, 赵彬, 等. 右美托咪定联合浅低温对新生大鼠全脑缺血再灌注损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2015, 35(1): 107-110.
- [7] 李英娜, 刘志建, 佟德惠. 右美托咪定对反复缺血-再灌注脑损伤小鼠学习记忆能力的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(10): 997-1002.
- [8] Kim JY, Lee YW, Kim JH, et al. Agmatine attenuates brain edema and apoptotic cell death after traumatic brain injury. *J Korean Med Sci*, 2015, 30(7): 943-952.
- [9] Lo Pizzo M, Schiera G, Di Liegro I, et al. Aquaporin-4 distribution in control and stressed astrocytes in culture and in the cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injuries. *Neurol Sci*, 2013, 34(8): 1309-1314.
- [10] 邱永升, 贾英萍, 徐庆. 大鼠脑损伤后 α_2 肾上腺素能受体激动剂对神经的保护作用. *中华医学杂志*, 2016, 96(28): 2246-2250.
- [11] Ren Z, Iliff JJ, Yang L, et al. 'Hit & Run' model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(6): 834-845.
- [12] Snow WM, Stoesz BM, Kelly DM, et al. Roles for NF- κ B and gene targets of NF- κ B in synaptic plasticity, memory, and navigation. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(2): 757-770.
- [13] Wang SL, Duan L, Xia B, et al. Dexmedetomidine preconditioning plays a neuroprotective role and suppresses TLR4/NF- κ B pathways model of cerebral ischemia reperfusion. *Biomed Pharmacotherapy*, 2017, 93(9): 1337-1342.
- [14] Wan Q, Xu L, Bo Y. Effects of dexmedetomidine combined with dezocine on cognition function and hippocampal microglia activation of rats. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9): 2787-2792.

(收稿日期:2017-04-01)