

舒芬太尼后处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

程 岑, 顾尔伟, 鲁显福, 刘训芹, 张 雷, 陈菁菁

摘要 目的 观察舒芬太尼后处理对大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)所致局灶性脑缺血再灌注损伤(CIRI)的保护作用。方法 健康成年雄性SD大鼠70只,随机分为5组:假手术组(sham组)、缺血再灌注组(IR组)、舒芬太尼0.3 μg/kg组(SP1组)、舒芬太尼1 μg/kg组(SP2组)、舒芬太尼3 μg/kg组(SP3组)。IR组、SP1组、SP2组和SP3组动物均用线栓法制备右侧MCAO模型,栓塞90 min后恢复再灌注。SP1组、SP2组和SP3组于再灌注前5 min尾静脉注射舒芬太尼0.3、1、3 μg/kg, sham组和IR组于再灌注前5 min尾静脉注射等容积生理盐水,均于1 min内注射完毕。于再灌注24 h行神经功能障碍(NDS)评分,随后每组取6只动物断头取脑行2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色,扫描并计算脑梗死容积百分比,每组剩余大鼠采用原位末端标记(TUNEL)法检测再灌注24 h皮层区缺血半暗带细胞凋亡。结果 IR后动物均表现一定程度神经功能障碍,再灌注24 h, SP2组及SP3组NDS评分明显低于IR组,脑梗死容积百分比明显低于IR组,皮层区缺血半暗带细胞凋亡指数明显低于IR组($P < 0.05$),而SP1组NDS评分、梗死容积百分比和凋亡指数与IR组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论

舒芬太尼1 μg/kg后处理可减轻大鼠CIRI。

关键词 舒芬太尼;后处理;脑缺血再灌注损伤

中图分类号 R 338.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0883-04

急性脑梗死患者早期溶栓治疗能挽救“处于缺血半暗带的神经元”,有确定性治疗意义^[1]。而血流再灌注缺血组织会加重其结构破坏和功能障碍,称之为脑缺血再灌注损伤^[2](cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)。随着溶栓治疗的开展, CIRI的机制及其防治已成为国内外研究热点。舒芬太尼作为主要激动μ受体的阿片受体激动剂,亲脂性约为芬太尼的两倍,更易通过血脑屏障,对血流动力学影响轻微,镇痛效果强大,在临床麻醉中尤其是心脑血管手术麻醉中应用广泛。动物研究^[3]表明,

舒芬太尼后处理可模拟缺血后处理,诱导心肌缺血耐受的产生。舒芬太尼后处理是否能减轻CIRI,尚未见文献报道。因此,该研究用大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察舒芬太尼后处理对脑保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠70只,250~300 g,购自安徽医科大学实验动物中心。实验遵循安徽省实验动物管理条例,尽量减少动物承受的痛苦。

1.1.2 药品与试剂 舒芬太尼(湖北宜昌人福药业有限责任公司,批号:081106);1%氯化三苯基四氮唑(TTC)(美国Sigma公司);原位末端标记(TUNEL)试剂盒(美国Roche公司)。

1.1.3 主要仪器 切片机(德国莱卡RM2015);多功能真彩色细胞图象分析管理系统(美国Media Cybernetics公司Image-Pro Plus)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理 70只大鼠随机分为5组。假手术组(sham组):分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),不做缺血处理;缺血再灌注组(IR组):阻闭大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)血流90 min后恢复灌注;舒芬太尼后处理组SP1组、SP2组及SP3组:手术操作同IR组,并于再灌注前5 min尾静脉注射舒芬太尼0.3、1、3 μg/kg, sham组和IR组于同一时刻尾静脉注射等容积生理盐水,均于1 min内注射完毕。

1.2.2 MCAO模型的制作及筛选 采用改良的Longa线栓法^[4],10%水合氯醛30 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠后,颈部正中切口,分离右侧CCA至颈动脉分叉处。结扎CCA近心端,两个微动脉夹分别夹闭颈外动脉(external carotid artery, ECA)近心端和CCA远心端,在CCA上用缝合线打一活结,眼科剪在CCA距颈动脉分叉5 mm处剪一缺口,将栓线(φ 0.26 mm鱼丝线,头端蘸石蜡)经缺口插入CCA。松开CCA上动脉夹,调整进线角度(向左侧倾斜约

2014-03-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81341014)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院麻醉科,合肥 230022

作者简介:程 岑,女,硕士研究生;

顾尔伟,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: ay_guew_mz@163.com

20°角) ,使栓线进入 ICA。再次调整进线角度(向右侧倾斜约 15°角) ,并轻轻牵拉 CCA ,使栓线进入大脑 进入(18 ± 0. 5) mm 稍有阻力感时表明已阻断大脑前动脉(anterior cerebral artery , ACA) 至 MCA 的血供 ,即可造成 MCA 的栓塞 ,将 CCA 上活结扎紧 ,并松开 ECA 上的动脉夹 ,缝合皮肤。缺血 90 min ,再灌注时轻轻将线栓头端拉退至 CCA ,剪掉多余线栓即可。在实验过程中使用电热毯保持大鼠体温在 37 ~ 38 ℃。经历缺血再灌注的大鼠麻醉苏醒后 ,参考 Longa et al^[5] 的文献报道 ,使用六级评分法 0 分: 无功能障碍; 1 分: 不能伸展左侧前肢; 2 分: 向左侧旋转; 3 分: 向左侧倾倒; 4 分: 无自主活动伴意识障碍; 5 分: 死亡; 评分为 0 分或 5 分的予以剔除。

1.2.3 观察指标 ① 动物恢复及神经功能损害评估: 麻醉苏醒后 ,单笼饲养 ,自由饮食。脑缺血再灌注后 24 h ,由不了解分组情况的观察者评估记录神经功能障碍评分(neurological deficit score , NDS) ,方法参考 Longa 的六级评分法。② TTC 染色及脑梗死灶测量: 再灌注 24 h 神经功能障碍评分完成后 ,每组各取 6 只动物深麻醉后断头取脑 ,于 - 20 ℃ 冰箱中冷冻 20 min ,取冠状面用脑槽均匀切成 2 mm 厚脑片 ,迅速放入 TTC 溶液中 37 ℃ 染色 30 min ,10% 甲醛溶液固定 15 min 后 ,扫描仪扫描脑片 ,采用 Image Pro Plus 5. 0 图象分析软件(Media Cybernetics 公司 ,美国) 计算脑梗死容积(粉红色区为正常脑组织 ,白色区为梗死区) 百分比 ,为排除缺血所致脑组织水肿造成的计算偏差 ,采用规范化的计算公式: (对侧大脑半球总容积 - 同侧大脑半球非梗死组织容积) /对侧大脑半球总容积 × 100%^[6]。③ 皮层区缺血半暗带细胞凋亡检测: 再灌注 24 h 后 ,每组剩余动物深麻醉后处死取右侧大脑半球组织用冰生理盐水冲去残血 ,4% 多聚甲醛固定制备石蜡切片 ,根据 Roche 公司 TUNEL 试剂盒说明方法进行细胞凋亡检测。显微镜下观察皮层区缺血半暗带(矢状裂至外侧裂上中 1/3 皮质交界处)^[6] ,随机取 4 个不连续高倍(× 400) 视野计算视野内凋亡细胞数占细胞总数的百分比 ,得细胞凋亡指数(apoptosis index ,AI) 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13. 0 统计软件分析 ,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间分析采用单因素方差分析 ,组内比较采用重复测量设计的方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 70 只大鼠中有 4 只于造模后 NDS 评分 0 分 ,无神经功能障碍; 3 只因神经功能损伤过重而于 24 h 内死亡; 4 只在舒芬太尼给药时呼吸抑制而死亡; 均予以剔除。实际观察 60 只大鼠。

2.2 NDS 评分 再灌注 24 h ,各组间检验统计量 *F* 值为 77. 14 ,IR 组大鼠 NDS 评分明显高于 sham 组 (*P* < 0. 05) ; 与 IR 组相比 ,SP2 组及 SP3 组可明显改善大鼠缺血再灌注后神经功能障碍 (*P* < 0. 05) ; 而 SP1 组与 IR 组 NDS 评分差异无统计学意义 (*P* > 0. 05) ,见图 1。

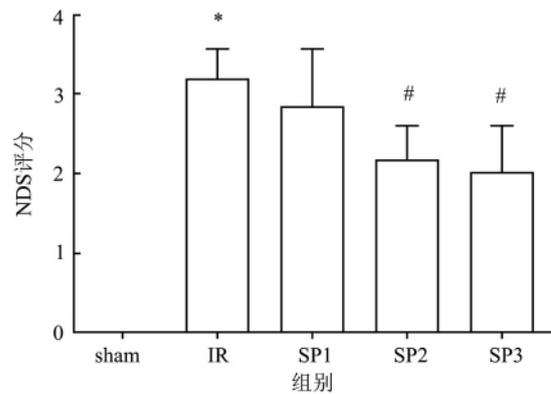


图 1 5 组大鼠再灌注 24 h NDS 评分 (*n* = 12 , $\bar{x} \pm s$) 与 sham 组比较: * *P* < 0. 05; 与 IR 组比较: # *P* < 0. 05

2.3 脑梗死容积百分比及 AI 5 组大鼠再灌注 24 h ,各组间检验统计量 *F* 值为 234. 5 ,IR 组脑梗死容积百分比明显高于 sham 组 (*P* < 0. 05) ; SP2 组及 SP3 组脑梗死容积百分比明显低于 IR 组 (*P* < 0. 05) ,SP1 组及 IR 组间差异无统计学意义 ,见表 1、图 2。TUNEL 染色结果显示 ,sham 组偶见凋亡细胞 ,IR 组、SP1 组、SP2 组与 SP3 组皮层区缺血半暗带均可见呈棕黄染色的凋亡细胞。各组间检验统计量 *F* 值为 475. 3 ,与 sham 组相比 ,IR 组 AI 升高 (*P* < 0. 05) ; 与 IR 组相比 ,SP2 组及 SP3 组 AI 降低 (*P* < 0. 05) ; 而 SP1 组与 IR 组间差异无统计学意义 ,见表 1、图 3。

表 1 5 组大鼠再灌注后 24 h 脑梗死容积百分比及 AI (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	脑梗死容积百分比	AI
sham	0	4. 43 ± 0. 17
IR	32. 11 ± 2. 56*	35. 33 ± 2. 05*
SP1	31. 13 ± 2. 47	35. 65 ± 1. 18
SP2	20. 51 ± 2. 16#	24. 55 ± 1. 27#
SP3	21. 59 ± 2. 00#	27. 53 ± 1. 83#

与 sham 组比较: * *P* < 0. 05; 与 IR 组比较: # *P* < 0. 05



图2 再灌注 24 h TTC 染色(红色为正常脑组织,白色为梗死区)

A: sham 组; B: IR 组; C: SP1 组; D: SP2 组; E: SP3 组

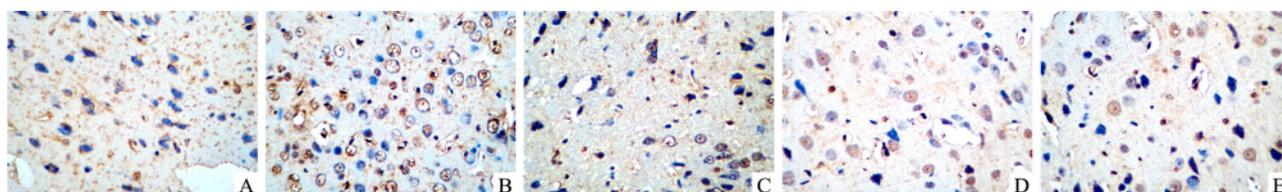


图3 再灌注 24 h 皮层区缺血半暗带 TUNEL 染色 DAB×400 (凋亡细胞的核呈棕黄色着色,着色不均)

A: sham 组; B: IR 组; C: SP1 组; D: SP2 组; E: SP3 组

3 讨论

本研究参照文献^[7-8]和预实验结果选择舒芬太尼 0.3、1、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后处理观察对大鼠局灶性 CIRI 的影响,结果显示舒芬太尼 1、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后处理能减轻大鼠局灶性 CIRI 后神经功能缺损,缩小脑梗死容积百分比,减少皮层缺血半暗带细胞凋亡。舒芬太尼 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后处理缩小梗死容积百分比效果更佳,且实验中剔除的 4 只呼吸抑制的大鼠均来自 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后处理组,在本研究中保留大鼠自主呼吸,而 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后处理易引起严重呼吸抑制乃至死亡,因此认为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为舒芬太尼后处理最佳剂量组。

阿片类药物在 CIRI 病理生理过程中有重要作用,阿片受体激动剂可模拟缺血后处理相关机制发挥脑保护作用。阿片受体激动剂芬太尼通过改善缺血大脑皮层血流,减轻脑水肿^[9];瑞芬太尼通过降低 TNF- α 的表达抑制过度炎症反应等途径减轻 CIRI^[10]。舒芬太尼可能通过结合并激动相应阿片受体,介导 KATP 通道开放,激活磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 通路^[11] 发挥脑保护作用。PI3K/蛋白激酶 B (PKB/Akt) 通路作为再灌注损伤补救激酶通路重要组成部分,其激活可减轻 CIRI,机制可能为减少氧自由基生成、抑制炎症反应、抑制神经细胞凋亡^[12] 等。

μ 、 κ 、 δ 3 种类型阿片受体在中枢神经系统均有分布。目前对 3 种阿片受体在 CIRI 中的作用有很大争议,较一致的观点认为 δ 受体和 κ 受体的激活参与了脑缺血的保护,而 μ 受体在脑缺血再灌注中

发挥的作用有待进一步研究证实。国外研究^[13]表明 κ 受体激动剂 BRL52537 可通过降低神经元型一氧化氮合酶的活性,减少缺血诱发的一氧化氮生成来减轻小鼠缺血再灌注损伤。 δ 阿片受体的激活可调控缺血缺氧导致的神经元内离子内稳态失衡,抑制细胞膜钠离子内流,减轻钙超载以减轻细胞内钾离子过度外流,从而通过磷脂肌醇信号途径发挥神经保护作用^[14]。Wang et al^[15] 发现 δ 受体激动剂 DADLE (Delta opioid peptide [d-Ala2, d-Leu5] enkephalin) 后处理可减少大鼠缺血再灌注后海马 CA1 区神经元凋亡,改善空间学习和记忆功能,这些效应与 δ 受体激活以及 PI3K/Akt 通路激活有关。阿片受体的药理作用非常复杂,并且不同类型阿片受体功能上有相互作用,现有研究^[16] 显示 μ 受体和 δ 受体之间存在相互作用。舒芬太尼主要激动 μ 受体,对 κ 、 δ 受体作用较弱,其脑保护效应主要与哪一类型阿片受体有关仍需进一步探讨。

总之,本实验证实舒芬太尼 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后处理能显著改善大鼠的神经功能缺陷症状,且梗死容积最小,对 CIRI 具有保护意义。

参考文献

- [1] Shi J, Liu Y, Duan Y et al. A new idea about reducing reperfusion injury in ischemic stroke: Gradual reperfusion [J]. Med Hypotheses, 2013, 80(2): 134-6.
- [2] Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(5): 873-85.
- [3] 吴云, 顾尔伟, 方卫平等. 舒芬太尼后处理对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46

- (7): 652–5.
- [4] 王毅刚, 王允, 孙晓晶, 等. 大鼠线栓法局灶性脑缺血再灌注损伤模型改进的实验研究[J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(9): 568–70.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [6] Joo S P, Xie W, Xiong X, et al. Ischemic postconditioning protects against focal cerebral ischemia by inhibiting brain inflammation while attenuating peripheral lymphopenia in mice[J]. *Neuroscience* 2013, 23(243): 149–57.
- [7] 马锐, 路志红, 熊利泽, 等. 舒芬太尼预先给药对大鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2009, 25(11): 978–9.
- [8] 苗晓茹, 熊利泽, 王强, 等. 雷米芬太尼预处理对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2006, 22(4): 277–9.
- [9] Chi O Z, Hunter C, Liu X, et al. Effects of fentanyl pretreatment on regional cerebral blood flow in focal cerebral ischemia in rats[J]. *Pharmacology*, 2010, 85(3): 153–7.
- [10] Jeong S, Kim S J, Jeong C, et al. Neuroprotective effects of remifentanyl against transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *J Neurosurg Anesthesiol* 2012, 24(1): 51–7.
- [11] Pateliya B B, Singh N, Jaggi A S. Possible role of opioids and KATP channels in neuroprotective effect of postconditioning in mice[J]. *Biol Pharm Bull* 2008, 31(9): 1755–60.
- [12] Zhu Y M, Wang C C, Chen L, et al. Both PI3K/Akt and ERK1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Brain Res* 2013, 14(94): 1–8.
- [13] Zeynalov E, Nemoto M, Hum P D, et al. Neuroprotective effect of selective kappa opioid receptor agonist is gender specific and linked to reduced neuronal nitric oxide[J]. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006, 26(3): 414–20.
- [14] Chao D, Xia Y. Ionic storm in hypoxic/ischemic stress: can opioid receptors subside it[J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 90(4): 439–70.
- [15] Wang S, Duan Y, Su D, et al. Delta opioid peptide [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin (DADLE) triggers postconditioning against transient forebrain ischemia[J]. *Eur J Pharmacol* 2011, 658(2–3): 140–4.
- [16] Bodnar R J. Endogenous opiates and behavior: 2008[J]. *Pep-tides* 2009, 30(12): 2432–79.

Sufentanil postconditioning induces protection against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

Cheng Cen, Gu Erwei, Lu Xianfu, et al

(Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate whether sufentanil postconditioning induces protection against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Seventy healthy adult male SD rats weighing 250–300 g were randomly divided into five groups. All rats in IR group, SP1 group, SP2 group and SP3 group were subjected to the right middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 90 min and 24 h reperfusion. At 5 min before reperfusion, the rats were intravenously injected sufentanil 0.3 μg/kg (SP1 group), 1 μg/kg (SP2 group), 3 μg/kg (SP3 group) or normal saline (sham group and IR group). The neurological deficit scores (NDS) were evaluated at 24 h after reperfusion, then all the animals were executed. Six rats in each group were executed to evaluate the infarct volume of the brain. The remaining rats in each group were executed to detect the apoptosis index. Infarct volume, as a percentage of volume at normal cerebral hemisphere, was determined by 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) staining. The neuronal apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL). **Results** At 24 h after reperfusion, the neurological deficit scores and the apoptosis index in the SP2 group and SP3 group were significantly lower than those in the IR group ($P < 0.05$), the infarct volume in the SP2 group and SP3 group was significantly smaller than that in the IR group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the neurological deficit scores, apoptosis index and infarct volume between groups of SP1 and IR. **Conclusion** Sufentanil postconditioning at a dosage of 1 μg/kg can provide neuroprotection against focal ischemia-reperfusion injury in rats.

Key words sufentanil; postconditioning; cerebral ischemia-reperfusion