

秦燕,杨光. 基于 CXCR4-FAK 信号通路观察鞘内注射右美托咪定改善大鼠脊髓缺血再灌注损伤后神经运动功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 77-85.

Qin Y, Yang G. Intrathecal injection of dexmedetomidine improves neuromotor function in rats with spinal cord ischemia-reperfusion injury based on the CXCR4-FAK signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(4): 77-85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.04.012

基于 CXCR4-FAK 信号通路观察鞘内注射右美托咪定改善大鼠脊髓缺血再灌注损伤后神经运动功能

秦 燕¹, 杨 光^{2*}

(1.成都体育学院附属体育医院,成都 610000; 2.四川省骨科医院,成都 610000)

【摘要】 目的 基于 CXC 趋化因子受体 4-粘着斑激酶(CXCR4-FAK)信号通路探讨鞘内注射右美托咪定(DHI)改善大鼠脊髓缺血再灌注损伤(SCIRI)后神经运动功能。**方法** 将 60 只 10~12 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为 4 组($n=15$):sham 组、模型组、DHI 组、DPA 组。模型组、DHI 组、DPA 组开胸夹闭主动脉弓 15 min 构建 SCIRI 模型,sham 组仅开胸游离主动脉弓,不夹闭处理。DHI 组、DPA 组大鼠在缺血前 72 h 鞘内分别注射 DHI 和 Diprotin A,注射剂量 30 μ L,浓度 5 μ mol/L,sham 组、模型组注射等量生理盐水,每日定点注射 1 次,连续 3 d。造模后第 4 天采用改良的 Tarlov 评分方法、伊文思蓝(EB)染色、干湿法、电镜、TUNEL 染色、DCFH-DA 染色及试剂盒、Western blot 检测各组大鼠神经运动功能评分、血-脊髓屏障(BSCB)结构完整性、脊髓组织含水量、脊髓组织超微结构改变、细胞凋亡、氧化应激反应以及 CXCR4、p-FAK 蛋白的表达水平。**结果** 与 sham 组相比,模型组大鼠神经运动功能评分、超氧化物歧化酶(SOD)活性明显降低,脊髓组织的含水量、EB 红色荧光强度、细胞凋亡率、活性氧(ROS)绿色荧光强度、丙二醛(MDA)的含量、CXCR4、p-FAK 的表达水平明显升高;与模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠脊髓组织神经运动功能评分、SOD 酶活性、CXCR4、p-FAK 的表达水平明显升高,脊髓组织的含水量、EB 红色荧光强度、细胞凋亡率、ROS 绿色荧光强度、MDA 的含量明显降低;差异均具有统计意义($P<0.05$);DHI 组和 DPA 组相比,差异不明显($P>0.05$),不具有统计学意义。**结论** 右美托咪定对 SCIRI 大鼠的保护作用,可能是通过激活 CXCR4-FAK 信号通路,降低细胞的氧化应激损伤,以发挥对 SCIRI 大鼠脊髓组织的保护作用。

【关键词】 右美托咪定;脊髓缺血再灌注;CXCR4-FAK 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 04-0077-09

Intrathecal injection of dexmedetomidine improves neuromotor function in rats with spinal cord ischemia-reperfusion injury based on the CXCR4-FAK signaling pathway

QIN Yan¹, YANG Guang^{2*}

(1. Sports Hospital Affiliated to Chengdu Institute of Physical Education, Chengdu 610000, China.
2. Sichuan Orthopedic Hospital, Chengdu 610000)

【Abstract】 Objective To investigate whether the protective mechanism by which intrathecal injection of dexmedetomidine improves neuromotor function in rats with spinal cord ischemia-reperfusion injury is based on the CXCR4-

【作者简介】秦燕(1981—),女,主治,本科,研究方向:骨科麻醉。E-mail: g5fmv9@163.com

【通信作者】杨光(1984—),男,主治,本科,研究方向:骨科麻醉。

FAK signaling pathway. **Methods** Sixty SPF-grade SD male rats aged 10–12 weeks were randomly divided into four groups ($n=15$ per group): the sham group, model group, DHI group, and DPA group. The SCIRI model was constructed in the model, DHI, and DPA groups by opening the thoracic clipped aortic arch for 15 min. In the sham group, the thoracic free aortic arch was only opened, without clamping. After successful establishment of the model, each rat was fed in a single cage with conventional feed and a standard diet. The DHI and DPA groups were injected in the sheath 72 h before ischemia with DHI and Diprotin A, respectively, with a dose of 30 μL at a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$. The sham and model groups were injected with the same volume of normal saline, with a fixed point injection once daily for 3 consecutive days. On day 4 after modeling, the neuromotor function score, blood-spinal cord barrier structural integrity, water content, ultrastructural changes, apoptosis, oxidative stress response, and the expression levels of CXCR4 and p-FAK were detected using the improved Tarlov scoring method, Evans blue (EB) staining, wet/dry weight method, electron microscopy, TUNEL staining, DCFH-DA staining kit, and western blot techniques, respectively. **Results** Compared with the sham group, the neuromotor function score and SOD activity of the model group were significantly decreased. In contrast, the water content of the spinal cord, EB red fluorescence intensity, apoptosis rate, ROS green fluorescence intensity, MDA content, and CXCR4 and pFAK expression levels were significantly increased. Compared with the model group, the neuromotor function score, SOD activity, and CXCR4 and pFAK expression levels in the spinal cord were significantly increased in the DHI and DPA groups. In contrast, the water content of the spinal cord, EB red fluorescence intensity, apoptosis rate, the green fluorescence intensity of ROS, and MDA content were significantly lower, and these differences were statistically significant ($P<0.05$). There were no significant differences between the DHI and DPA groups ($P>0.05$). **Conclusions** The protective effect of dexmedetomidine on SCIRI rats may be caused by the activation of the CXCR4-FAK signaling pathway, thus reducing oxidative stress injury in cells, and playing a protective role in the spinal cord of SCIRI rats.

[Keywords] dexmedetomidine; spinal cord ischemia-reperfusion; CXCR4-FAK signaling pathway

脊髓缺血再灌注损伤 (spinal ischemia reperfusion injury, SCIRI) 在脊柱外科手术、血管畸形手术、胸主动脉瘤切除手术以及心脏手术体外循环期间中较为常见,具有潜在致残、致死性^[1]。SCIRI 的发病机制尚不明确,但研究表明^[2]氧化应激中的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量蓄积导致的细胞凋亡,以及血-脊髓屏障 (blood-spinal cord barrier, BSCB) 结构的破坏是 SCIRI 的最重要的病理改变^[3]。因此寻找有效的药物或者治疗手段降低 SCIRI 后细胞内的 ROS 含量,降低细胞的凋亡率,以及保护 BSCB 的完整性是当前脊髓损伤防治与再生修复中研究的热点。右美托咪定是一种高选择性的肾上腺受体激动剂。药理研究表明^[4]右美托咪定具有优良的镇静、抗焦虑和镇痛的作用。研究证实^[5]右美托咪定能够在 SCIRI 中发挥抗氧化、抑制细胞凋亡等作用。CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor-4, CXCR4)/粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 信号是重要的内源性的氧化应激信号通路之一^[6]。王丽萍等^[7]研究表明 CXCR4-FAK 信号能促进骨髓间充质干细胞向大鼠 SCIRI 组织的迁移,增强其粘附能力,降低氧化应激,减少 ROS 的集聚,发挥对大鼠脊髓的保护作用。因此本研究构建大鼠 SCIRI 模型,探讨右美托咪定

通过 CXCR4-FAK 信号通路的调节对大鼠 SCIRI 的保护作用,从而为临床提供新的数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10~12 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠共计 60 只,体重在 220~250 g,由我院实验动物实验中心提供 [SCXK(川)2018-211];所有动物均在四川省实验动物专委会养殖场 SPF 级动物房饲养 [SYXK(川)2018-14],室温下标准饲料、自由饮水、分笼 (4 笼) 适应性饲养 1 周后用于试验。动物的使用及实验操作按照本院实验动物管理委员会 (IACUC-JY-2018-075) 的规定执行。实验过程中依照 3R 原则给予所有动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸右美托咪定注射液 (dexmedetomidine hydrochloride injection, DHI, 江苏恒瑞医药股份有限公司,生产批号为:国药准字 H20090248); CXCR4 激动剂 Diprotin A (美国 cell signal 公司,批号: A13074)。

伊文思蓝 (evans blue, EB) 采购自 Sigma 公司,生产批号:BCBL1305 V; TUNNEL 试剂盒、DCFH-DA 试剂盒购自美国 Selleck 公司; BCA 蛋白浓度测定试

剂盒、DAB 化学发光试剂盒采购自天津百浩鑫生物有限公司; CXCR4、p-FAK 抗体采购自 Santa 公司; 戊巴比妥钠(德国进口分装, 250 g/瓶)、多聚甲醛(批号: 050406)、二甲苯(批号 83090501)采购自美国 PALL 公司; 冰冻切片包埋剂采购自美国樱花公司; Western blot 试剂盒购自美国 abcam 公司。

苏净 Airtech 超净工作台(北京六一仪器厂); 显微镊(型号: 15 cm 15 m/m)、显微剪(型号: III 14 cm)(浙江宁波医用缝针厂); Titan G2 60-300 电镜(美国 FEI 公司); 组织包埋机(型号: LEICAEG1150)(德国 Leica 公司); Nikon Ti-U/Ti-s 倒置荧光显微镜(型号: H-7650)(日本三菱公司); 5810R 型高速离心机(日本岛津公司); E-Gel Imager 凝胶成像仪(美国 Beckma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建和分组处理

将 60 只 10~12 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为 4 组($n=15$): 假手术组(sham 组)、模型组、右美托咪定组(DHI 组)、CXCR4-FAK 信号通路激动剂 Diprotin A 组(DPA 组)。参照文献制作大鼠 SCIRI 模型^[8]: 大鼠注射麻醉后, 常规备皮、消毒, 取右侧卧位, 固定在手术台上, 在肋缘行纵切口, 在显微镜下使用显微剪逐层分离, 直至完全暴露大鼠左肺上叶, 医用无菌纱布将肺部保护后, 从心包处开始分离胸主动脉, 使用无创动脉夹在主动脉弓锁骨上左动脉起始点处加闭 15 min 后, 移除动脉夹, sham 组不做加闭处理, 常规无菌逐层缝合伤口, 为防止感染术后需要尾静脉注射 0.2 mL 氨苄青霉素(100 mg/mL)。构建动物模型成功后, 每只大鼠单笼饲养, 常规饲料, 标准饮食喂养。DHI 组、DPA 组大鼠在造模前 72 h 鞘内分别注射 DHI 和 Diprotin A, 注射剂量 30 μ L, 浓度 5 μ mol/L, sham 组、模型组注射等量生理盐水, 每日定点注射 1 次, 连续 3 d。

1.3.2 各组大鼠下肢的神经运动功能评分

造模后第 4 天, 采用改良的 Tarlov 评分方法评价各组大鼠下肢的运动功能^[9], 评分标准为: 0 分: 几乎没有可觉察额下肢活动; 1 分: 大鼠有能被觉察的下肢关节自主活动; 2 分: 大鼠的后肢能自由活动, 但不能站立; 3 分: 大鼠能站立, 但不能行走; 4 分: 大鼠后肢运动功能基本恢复, 能正常行走。

1.3.3 伊文思蓝(evans blue, EB)染色检测各组大鼠 BSCB 的完整性

神经运动功能评价完毕后, 在 5 min 内, 尾静脉匀速注射 50 mL EB(10 mL/kg)。1 h 后处死大鼠, 常规无菌手段剥离大鼠的脊髓组织, 并迅速转移至深冷冰箱中。取大鼠的 L4 脊髓节段, 采用 4% 多聚甲醛固定、15%、20%、30% 蔗糖溶液沉糖, 冰冻切片, 在 Nikon Ti-U/Ti-s 倒置荧光显微镜下, 每个切片选择 6 个视野观察 BSCB 的完整性并进行统计分析。

1.3.4 干湿法检测各组大鼠脊髓的含水量

取出大鼠的 L5 脊髓节段, 首先用滤纸吸干脊髓表明水分, 称取湿重(W), 放入恒温烤箱中 24 h, 烤箱温度维持在 120℃, 之后称取干重(D)。大鼠脊髓含水量(%)=(W-D)/D $\times$ 100%。

1.3.5 电镜观察各组大鼠脊髓组织超微结构改变

取出大鼠的 10% L6 脊髓节段, 制成超薄组织切片: 采用 2.5% 聚甲醛预固定 15 min, 1% 锇酸固定 20 min, 无菌滤纸吸干水分, 环氧树脂(812)浸透包埋切片, 以醋酸双氧铀(uranyl acetate)及枸橼酸铅(lead citrate)做双重染色, 制成 50 nm 切片, 待切片完全干燥后载与铜网上, 上透射电镜观察大鼠脊髓组织超微病理结构。

1.3.6 TUNEL 染色检测各组大鼠脊髓组织中的细胞凋亡

从冰箱中取出 10% L6 脊髓节段, 常规方法固定, 冰冻切片, 二甲苯浸洗 2 次, 梯度酒精浸洗 5 min, 风干后 3% 双氧水-甲醇浸泡 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 然后 4℃ 预冷乙醇上进行如下操作: 0.1% TRITonX-100、0.1% 缓冲液处理 2 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 加入 TUNNEL 反应混合液, 加封口膜在暗湿盒中反应 1 h, 温度 37℃, PBS 漂洗, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 荧光显微镜进行观察, 每组切片 6 个不同的视野, 并通过 Image-Pro 6.2 软件处理图像, 统计分析大鼠脊髓组织细胞的凋亡率。

1.3.7 各组大鼠脊髓组织的氧化应激比较

取大鼠的 20% L6 脊髓节段, 10% 聚甲醛固定 2 h, 石蜡包埋并切片, 用 10 μ mol/L DCFH-DA 染色 2 h, 荧光显微镜下拍照。按照各试剂盒说明书要求, 使用 MDA 检测试剂盒和 SOD 检测试剂盒来检测腹动脉组织中与氧化反应相关的底物变化水平。

1.3.8 Western blot 检测各组大鼠脊髓组织中 CXCR4、p-FAK 的表达

取出大鼠的 20% L6 脊髓节段,研磨匀浆,加入 100 mL RIPA 裂解液,冰上超声处理 30 min 后,离心获得上清,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,每个样品取 50 μg,然后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、加入封闭液 4℃ 过夜孕育,然后分别加入一抗(1:1500),孕育 1 h,洗涤加入抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:10000),DAB 显色,以 GAPDH 作为内参分析蛋白相对表达水平;每个样品独立重复 3 次。

1.4 统计学方法

数据分析采用软件 SPSS 16.0,符合正态分布的计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间的比较采用单因素方差分析,两两组间的比较采用独立 *t* 检验,当 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

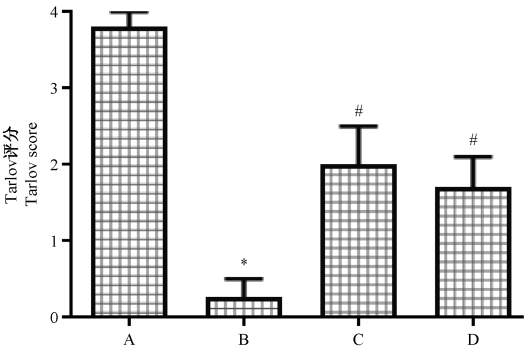
2.1 各组大鼠神经运动功能评分以及脊髓组织的含水量

如图 1 所示,与 sham 组相比,模型组大鼠神经运动功能评分明显降低($P < 0.05$),经药物干预后,与模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠神经运动功能评分明显升高($P < 0.05$),DHI 组和 DPA 组相比,差异不明显($P > 0.05$),无统计意义。

如图 2 所示,与 sham 组相比,模型组大鼠的脊髓组织的含水量明显升高($P < 0.05$),经药物干预后,与模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠的脊髓组织的含水量明显降低($P < 0.05$),DHI 组和 DPA 组相比,差异不明显($P > 0.05$),无统计意义。

2.2 EB 染色检测各组大鼠 BSCB 的完整性

注射伊文思蓝(evans blue, EB)入血后能与白蛋白特异性结合,形成稳定的 EB-白蛋白复合物。正常情况下,此复合物不能通过动物的血-脑和血-脊髓屏障,但是在血-脑和血-脊髓屏障结构被破坏后,才能渗出到神经组织中^[10],在荧光显微镜下,EB 呈现鲜亮的红色。本研究中 EB 染色结果如图 3 所示,sham 组大鼠未见红色荧光,表明 BSCB 结构完整;与 sham 组相比,模型组大鼠脊髓组织经 EB 染色后,可见红色荧光强度明显增强($P < 0.05$),并且主要位于脊髓灰质,说明模型组中 BSCB 结构的完整性已被破坏,白蛋白大量渗出;与模型组相比,DHI、DPA 组大鼠脊髓组织 EB 荧光强度明显减



注:A: sham 组;B: 模型组;C: DHI 组;D: DPA 组。与 sham 组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。下同。

图 1 各组大鼠神经运动功能评分($n = 10$)
Note. A, sham group. B, model group. C, DHI group. D, DPA group. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$. Same as below.

Figure 1 Comparison of neuromotor function scores

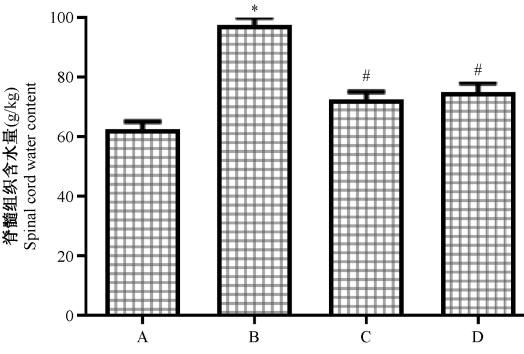


图 2 各组大鼠脊髓组织含水量的比较($n = 10$)

Figure 2 Comparison of spinal cord water content in each group of rats

弱($P < 0.05$),说明 DHI、DPA 组中 BSCB 结构的损伤有所恢复;DHI 组和 DPA 组相比,差异无统计意义($P > 0.05$)。

统计分析各组大鼠脊髓组织 EB 染色后白蛋白的渗出面积结果如图 3 所示,sham 组大鼠脊髓组织白蛋白的渗出的分布面积区域零;与 sham 组相比,模型组大鼠脊髓组织白蛋白的渗出的分布面积明显增大($P < 0.05$);与模型组相比,DHI、DPA 组大鼠脊髓组织白蛋白的渗出的分布面积明显减小($P < 0.05$);DHI 组和 DPA 组相比,差异无统计意义($P > 0.05$)。

2.3 电镜观察各组大鼠脊髓组织超微结构改变

电镜下观察大鼠脊髓组织的超微结构结果如图 4 所示,sham 组大鼠脊髓组织结构完整,髓鞘清

晰可辨,髓神经纤维排列紧密且有规则,髓鞘与轴突结构均可分辨,内外轴膜以及轴索结构正常,细胞内线粒体分布均匀,结构完整,线粒体嵴结构清晰可辨,未见凹陷或者缺失,核染色质分布均匀,核质界限清晰。模型组大鼠脊髓组织髓鞘结构改变明显,髓鞘间出现巨大间隙,原有的多层致密结构已经消失,或突出形成小囊泡,或断裂,脱髓鞘严重,细胞内线粒体肿胀明显,嵴结构排列紊乱,肿胀、凹陷、缺失明显,核染色质固缩,核膜扩张明显,核质界限不明。DHI 组、DPA 组大鼠脊髓组织髓神经纤维分布趋于正常,髓鞘结构趋于完整,只有少部分髓鞘板层松散,细胞内多数线粒体结构正常,嵴结构趋于正常。核染色质分布较为均匀,细胞核稍见肿胀,但比模型组以明显好转。

2.4 TUNEL 染色检测各组大鼠脊髓组织中的细胞凋亡

TUNEL 染色结果如图 5 所示,与 sham 组相比,

模型组大鼠脊髓组织内 TUNEL 阳性明显增多($P<0.05$),与模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠脊髓组织内 TUNEL 阳性明显减少($P<0.05$)DHI 组和 DPA 组相比,差异无统计意义($P>0.05$)。

统计分析各组大鼠脊髓组织的细胞凋亡率结果如 5 所示,与 sham 组相比,模型组的细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),与模型组相比,经过药物干预后,DHI 组、DPA 组大鼠的细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。DHI 组和 DPA 组相比,差异无统计意义($P>0.05$)。

2.5 各组大鼠脊髓组织中的氧化应激检测

本研究中采用 DCFH-DA 染色来检测大鼠脊髓组织中 ROS 的水平,DCFH-DA 染色结果如图 6 所示,sham 组大鼠脊髓组织中基本不见绿色荧光,与 sham 组相比,模型组中的 DCFH-DA 阳性细胞明显增多($P<0.05$),与模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠的 DCFH-DA 阳性细胞明显减少($P<0.05$),DHI 组和 DPA 组相比,差异无统计意义($P>0.05$)。

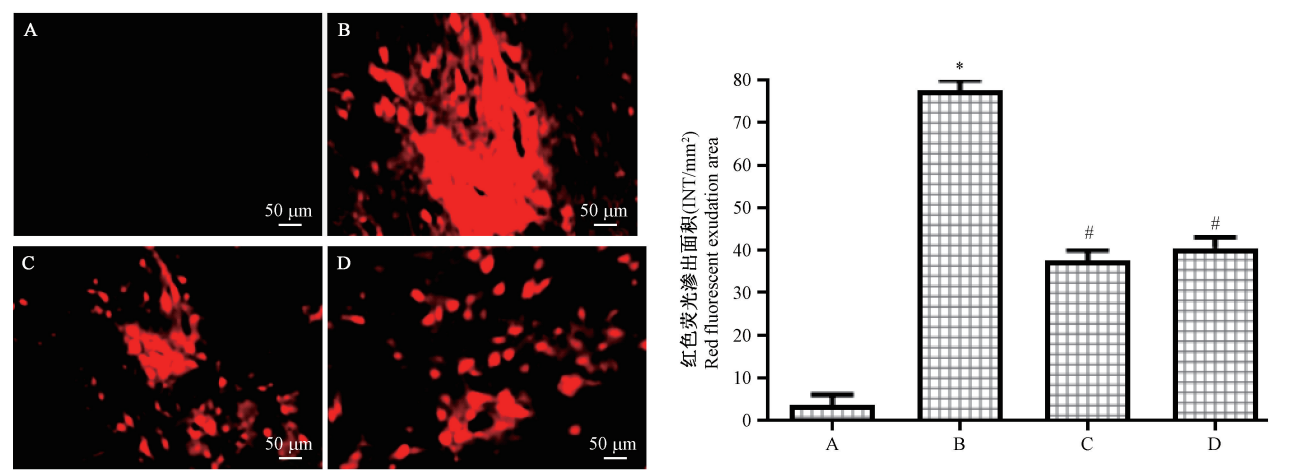
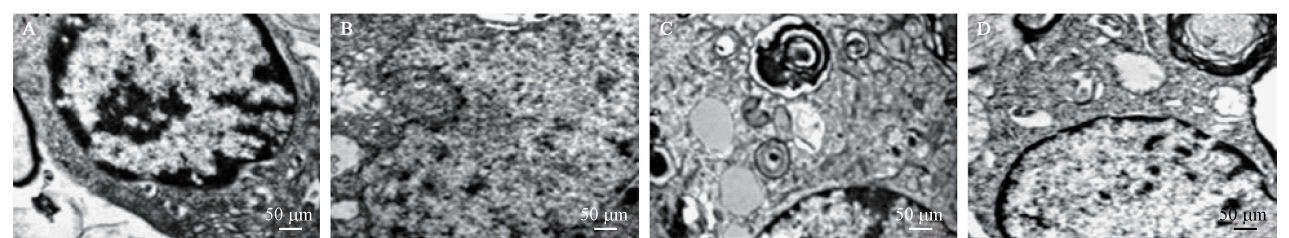


图 3 EB 染色结果($n=10$)
Figure 3 The result of EB staining



注:A; sham 组; B; 模型组; C; DHI 组; D; DPA 组。
图 4 电镜观察各组大鼠脊髓组织的超微结构改变($n=10$)

Note. A, sham group. B, model group. C, DHI group. D, DPA group.
Figure 4 Ultrastructural changes of spinal cord tissues of rats in each group observed by electron microscopy

统计分析绿色荧光强度结果如图 6 所示,与 sham 组相比,模型组大鼠脊髓组织中细胞的绿色荧光强度明显增强($P<0.05$),说明模型组大鼠脊髓组织内 ROS 水平明显升高;与模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠脊髓组织内细胞的绿色荧光强度明显减弱,说明大鼠脊髓组织内 ROS 水平明显降低;DHI 组和 DPA 组相比,差异无统计意义($P>0.05$)。

用试剂盒检测氧化应激反应中相关底物和酶活性,结果如图 7 所示,与 sham 组相比,模型组大鼠脊髓组织的 MDA 的含量明显增加,而 SOD 酶活性明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠脊髓组织内 MDA 的含量明显降低,而 SOD 酶活性明显增强,差异具有

统计学意义($P<0.05$),DHI 组和 DPA 组相比,差异无统计意义($P>0.05$)。

2.6 Western blot 检测各组大鼠脊髓组织中 CXCR4、p-FAK 的表达

为了进一步探讨右美托咪定对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的作用机制,本研究采用 Western blot 法检测大鼠脊髓组织中 CXCR4、p-FAK 蛋白的表达,结果如图 8 所示,与 sham 组相比,模型组大鼠脊髓组织中 CXCR4、p-FAK 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);和模型组相比,DHI 组、DPA 组大鼠脊髓组织中 CXCR4、p-FAK 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。DHI 组和 DPA 组相比,蛋白表达差异不明显($P>0.05$),不具有统计学意义。

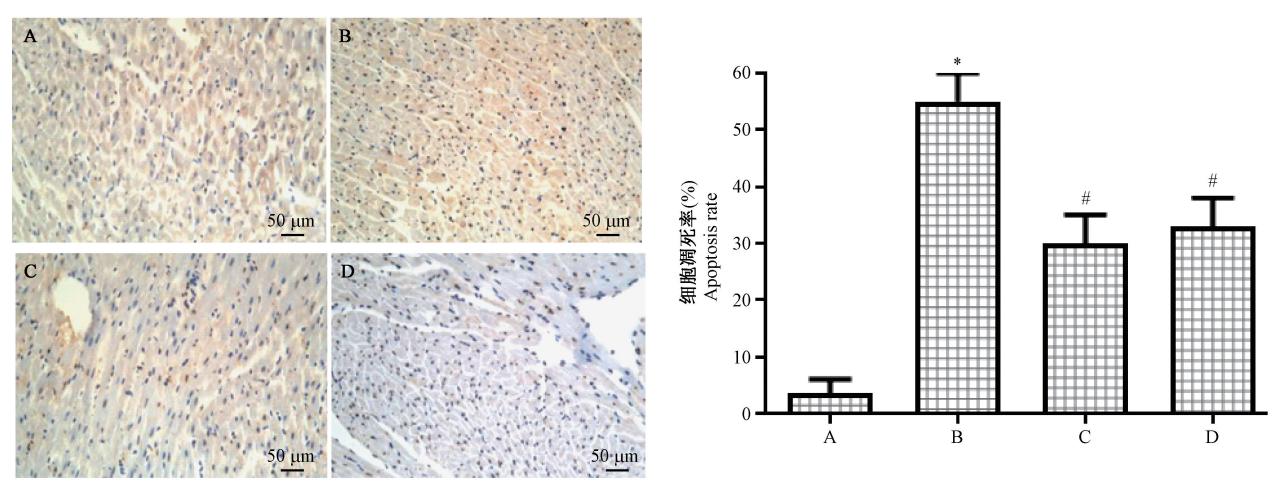


图 5 TUNEL 染色结果($n=10$)
Figure 5 The result of TUNEL staining

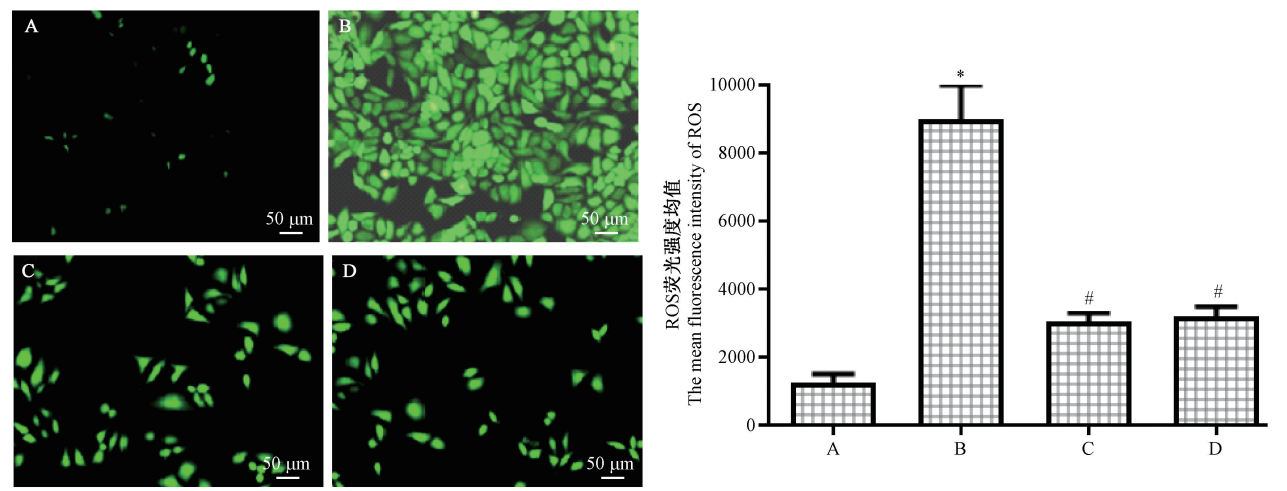


图 6 DCFH-DA 染色结果($n=10$)
Figure 6 The result of DCFH-DA staining

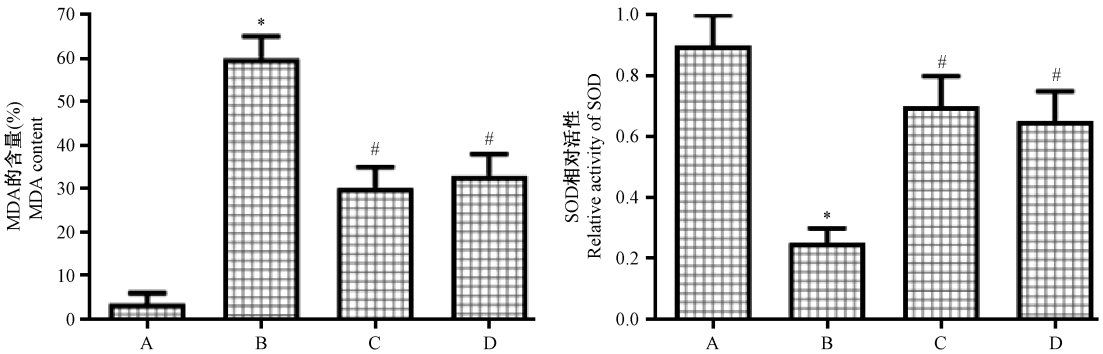


图 7 各组大鼠脊髓组织氧化应激反应中底物和酶的变化(n=10)

Figure 7 Changes of substrates and enzymes in the oxidative stress response of spinal cord tissue in each group of rats

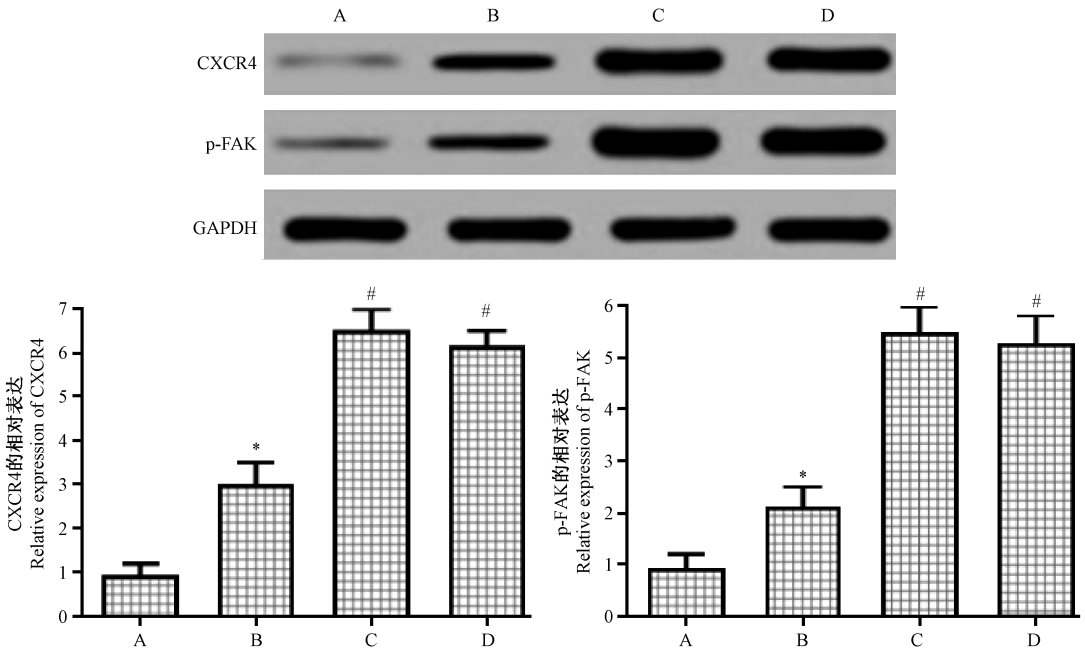


图 8 Western blot 法检测各组大鼠脊髓组织中 CXCR4、p-FAK 蛋白的表达(n=10)

Figure 8 Western blot detection the expression of CXCR4 and p-FAK protein in spinal cord tissue of rats in each group

3 讨论

SCIRI 作为原发性脊髓损伤后的继发性损伤是造成患者神经运动功能受损的重要因素。研究表明^[11]SCIRI 的病理过程主要是在导致脊髓缺血的因素去除后,脊髓重新供血,但神经功能却没有相对应恢复,反而是在缺血损伤的基础上进一步加重,进而导致脊髓神经元出现迟发性的细胞凋亡,难以维系血-脊髓屏障的完整性,造成患者的运动障碍。由此寻找一种能有效预防或者减轻由 SCIRI 后的神经细胞凋亡率的药物或者治疗手段是改善脊柱损伤患者治疗及预后的关键所在。

针对 SCIRI 的药物研发一直是医药界的研究重点。右美托咪定是临床上用于镇静、镇痛的一线药

物。大量的研究证实^[12]右美托咪定具有抗焦虑、稳定血流动力学、抑制交感神经兴奋、减少麻醉用药量、利尿以及抗寒颤的作用。临床研究表明^[13]右美托咪定在缺血再灌注损伤中具有明显的器官保护作用。张世平等^[14]研究表明右美托咪定可有效降低糖尿病大鼠心肌缺血再灌注时的心肌细胞的凋亡,降低炎症因子水平,具有明显的心脏保护作用。龚辉等^[15]研究证实右美托咪定可减轻大鼠脑缺血再灌注急性期的损伤,抑制神经元变性和凋亡,促进大鼠长期的神经功能恢复。姜远旭等^[16]研究表明右美托咪定则能够明显抑制 NF-κB 的表达,来缓解急性肾损伤后的氧化应激。本研究构建 SCIRI 大鼠模型后,模型组大鼠神经运动功能评分明显降低,脊髓组织的含水量明显增加,BSCB 完整

性被破坏;经过右美托咪定干预后 DHI 组大鼠神经运动功能评分明显升高,脊髓组织的含水量明显降低,BSCB 的完整性有所改善。说明右美托咪定对 SCI 大鼠的具有明显的治疗作用。

趋化因子受体 (chemokine receptor 4, CXCR4) 是基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) 特异性受体。SDF-1 α 与 CXCR4 结合后可通过 Gi 亚基激活其下游的胞质酪氨酸蛋白激酶 FAK,使其发生磷酸化生成 p-FAK。研究证实^[17] CXCR4-FAK 信号通路在骨髓源性细胞的黏附、迁移中的各环节中发挥关键作用。Li 等^[18] 研究证实 CXCR4-FAK 信号通路调控移植骨间充质干细胞向脊髓损伤后的部位迁移,阻滞细胞的异常凋亡,促进脊髓的修复。研究显示^[19] CXCR4-FAK 信号通路与胚胎期祖细胞的关系密切,由此 CXCR4-FAK 信号通路可促进机体内许多信号通路的激活,如 PI3K/AKT/mTOR 信号通路、RAS/MAPK 通路、JNK/p38MAP 信号通路等,增强细胞的趋化、运动、生长与增殖能力,以抵抗异常的细胞凋亡。当细胞出现应激损伤时,细胞因子表达增加,进而引起 CXCR4 的表达增加,原始细胞或者祖细胞的免疫应激开始响应,共同协调作用,激活 SOD 的酶活性等相关酶活性,促进 ROS 清除,抑制细胞的氧化应激以及细胞的异常凋亡,促进受损组织的再生、修复。Jiang 等^[20] 研究证实提高 CXCR4 表达后能明显抑制细胞内 ROS 的蓄积,下调细胞内的氧化应激。本研究使用 CXCR4 激动剂作为对照组,结果发现在提高 CXCR4 的表达后,大鼠脊髓组织的细胞凋亡率明显下降,细胞内 ROS 的含量明显降低,脊髓组织的氧化应激反应减弱,大鼠 SCI 损伤明显好转。观察指标的变化趋势与 DHI 组变化趋势一致,推断右美托咪定可能通过激活 CXCR4-FAK 信号通路发挥对 SCI 大鼠脊柱的保护作用。

综上所述,右美托咪定对脊髓缺血再灌注大鼠的保护作用,与 CXCR4-FAK 信号通路有关,其机制通过激活 CXCR4-FAK 信号通路,降低 ROS 的蓄积,抑制氧化应激导致的细胞凋亡,从而发挥对 SCI 后脊髓组织的保护作用。但右美托咪定是否通过其他信号通路发挥对脊髓组织的保护作用还待更深入的研究。

参考文献:

- [1] 余奇劲,解立杰,胡雯. 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.
- [2] Gökçe EC, Kahveci R, Gökçe A, et al. Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. J Neurosurg Spine, 2016, 24(6): 949-959.
- [3] Güler B, Kertmen H, Kasim E, et al. Neuroprotective effects of testosterone on ischemia/reperfusion injury of the rabbit spinal cord [J]. Injury, 2015, 46(2): 240-248.
- [4] Weerink MAS, Struys MMRF, Hannivoort LN, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexmedetomidine [J]. Clin Pharmacokinet, 2017, 56(8): 893-913.
- [5] Riquelme J A, Westermeier F, Hall A R, et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism [J]. Pharmacol Res, 2016, 103(7): 318-327.
- [6] Balsas P, Palomero J, Eguileor Á, et al. SOX11 promotes tumor protective microenvironment interactions through CXCR4 and FAK regulation in mantle cell lymphoma [J]. Blood, 2017, 130(4): 501-513.
- [7] 王丽萍,郭晓明,高贤伟,等. CXCR4-FAK 信号通路在低氧预处理骨髓间充质干细胞向大鼠脊髓缺血再灌注损伤组织迁移和粘附中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(6): 752-757.
- [8] Liu Y, Pan L, Jiang A, et al. Hydrogen sulfide upregulated lncRNA CasC7 to reduce neuronal cell apoptosis in spinal cord ischemia-reperfusion injury rat [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98(2): 856-862.
- [9] Morris SH, Howard JJ, El-Hawary R. Comparison of motor-evoked potentials versus somatosensory-evoked potentials as early indicators of neural compromise in rat model of spinal cord compression [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2017, 42(6): E326-E331.
- [10] Xu H, Li J, Wang Z, et al. Methylene blue attenuates neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage in rats through the Akt/GSK-3 β /MEF2D signaling pathway [J]. Brain Behav Immun, 2017, 65(10): 125-139.
- [11] Bao N, Hong MA. Sevoflurane preconditioning protects against spinal cord ischemia/reperfusion injury by up-regulating miR-199A-5p in rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(9): 1230-1234.
- [12] Fang B, Li X Q, Bi B, et al. Dexmedetomidine attenuates blood-spinal cord barrier disruption induced by spinal cord ischemia reperfusion injury in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(1): 373-383.
- [13] Liu J, Zhang S, Fan X, et al. Dexmedetomidine preconditioning ameliorates inflammation and blood-spinal cord barrier damage after spinal cord ischemia-reperfusion injury by down-regulation high mobility group box 1-toll-like receptor 4-nuclear factor κ B signaling pathway [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2019, 44(2): E74-E81.
- [14] 张世平,王臻,金梅梅,等. 右美托咪定对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制 [J]. 解放军医药杂志, 2018,

30(7): 13–17.
[15] 龚辉, 张巧梅, 王强, 等. 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): 138–142.
[16] 姜远旭, 夏明珠, 黄强, 等. 右美托咪定减轻失血性休克/复苏大鼠急性肾损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(4): 680–685.
[17] 陈雷, 程黎明, 胡笑. 基质细胞衍生因子-1/CXC 趋化因子受体-4 轴介导骨髓间充质干细胞迁移修复神经系统损伤的研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(11): 2345–2346.
[18] Li J, Guo W, Xiong M, et al. Effect of SDF-1/CXCR4 axis on the migration of transplanted bone mesenchymal stem cells mobilized by erythropoietin toward lesion sites following spinal cord injury [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(5): 1205–1214.
[19] Li M, Sun X, Ma L, et al. SDF-1/CXCR4 axis induces human dental pulp stem cell migration through FAK/PI3K/Akt and GSK3 β / β -catenin pathways [J]. Sci Rep, 2017, 7(9): 40161–40174.
[20] Jiang K, Li J, Zhang J, et al. SDF-1/CXCR4 axis facilitates myeloid-derived suppressor cells accumulation in osteosarcoma microenvironment and blunts the response to anti-PD-1 therapy [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75(10): 105818–105825.

[收稿日期] 2019–11–12

(上接第 18 页)

[7] Hedrick MH, Rice HE, Macgillivray TE, et al. Hematopoietic chimerism achieved by in utero hematopoietic stem cell injection does not induce donor-specific tolerance for renal allografts in sheep [J]. Transplantation, 1994, 58(1): 110–111.
[8] 黄小昆, 龙海, 苏锡雄, 等. 山羊胎肝内定位注射不同体积间充质干细胞对胎羊发育的影响 [J]. 西南国防医药, 2018, 28(1): 19–22.
[9] 周晓旭, 彭俊, 胡海, 等. TGF- β 3, HA, PTHrP 对人脐带间充质干细胞成软骨分化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 26–32.
[10] 朱慧, 叶莉, 何洁, 等. 小鼠脐带间充质干细胞的体外诱导分化 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 622–627.
[11] 庞荣清, 朱慧, 鄢东海, 等. GFP 标记脐带间充质干细胞治疗 mdx 小鼠的药代动力学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 54–58.
[12] Su Y, Chen Z, Yan L, et al. Optimizing combination of liver-enriched transcription factors and nuclear receptors simultaneously favors ammonia and drug metabolism in liver cells [J]. Exp Cell Res, 2018, 362(2): 504–514.
[13] Ko HL, Zhuo Z, Ren EC. HNF4a combinatorial isoform heterodimers activate distinct gene targets that differ from their corresponding homodimers [J]. Cell Rep, 2019, 26(10): 2549–2557.
[14] Cai W, Lin L, Hao H, et al. Yes-associated protein/TEA domain family member and hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4 α) repress reciprocally to regulate hepatocarcinogenesis in rats and mice [J]. Hepatology, 2017, 65(4): 1206–1221.

[收稿日期] 2019–09–21