

# 咪达唑仑与丙泊酚对局灶缺血再灌注大鼠脑水肿影响的对照研究\*

徐进步<sup>1</sup>, 施青山<sup>1△</sup>, 许鹏程<sup>2</sup>, 王 露<sup>2</sup>, 马艳艳<sup>1</sup>, 汪允珍<sup>1</sup> (1. 江苏省连云港市第二人民医院重症医学科 222000; 2. 徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 江苏徐州 221004)

**【摘要】 目的** 对比咪达唑仑与丙泊酚对脑局灶缺血再灌注后脑水肿状态的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 72 只随机分为四组:假手术组、脑缺血再灌注组、丙泊酚处理组、咪达唑仑处理组。采用大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血模型,缺血 2 h 再灌注 72 h 行神经功能缺损评分、断头取脑行脑梗死体积和脑含水量测量以及脑组织水通道蛋白 4(AQP4)表达的检测。**结果** 与缺血再灌注组相比,咪达唑仑与丙泊酚均能明显降低脑梗死体积,减轻脑水肿,降低 AQP4 的表达,两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 咪达唑仑具有与丙泊酚同等地减轻脑局灶缺血再灌注后水肿的作用,适合作为该疾病状态下的镇静药。

**【关键词】** 咪达唑仑; 丙泊酚; 缺血再灌注损伤; 脑水肿; 水通道蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.13.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)13-1834-03

## Comparative study on influences of midazolam and propofol on rat brain edema induced by ischemia/reperfusion injury\*

XU Jin-bu<sup>1</sup>, SHI Qing-shan<sup>1△</sup>, XU Peng-cheng<sup>2</sup>, WANG Lu<sup>2</sup>, MA Yan-yan<sup>1</sup>, WANG Yun-zhen<sup>1</sup> (1. Department of Intensive Care Medicine, Lianyungang Municipal Second People's Hospital, Lianyungang, Jiangsu 222000, China; 2. Key Laboratory Anesthesiology of Jiangsu Province, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

**【Abstract】 Objective** To compare the influences of midazolam and propofol on brain edema induced by ischemia/reperfusion(I/R) injury. **Methods** 72 male Sprague-Dawley(SD) rats were randomized into four groups: sham operation group undergoing sham operation; ischemia/reperfusion group undergoing the thread embolism of the left middle cerebral artery occlusion(MCAO) for 2 h and then removal of thread; propofol treatment group, which accepted propofol treatment on the basis of ischemia/reperfusion for 72 h; midazolam treatment group, which accepted midazolam treatment on the basis of ischemia/reperfusion for 72 h. After 72 h of reperfusion the rats were assessed and assigned the neurological deficit scores, then decapitated to evaluate the cerebral infarction volumes, brain water contents and the expression of AQP4. **Results** In the comparison with the I/R group, both the midazolam treatment group and the propofol treatment group could improve the neurological score, ameliorate brain edema, and down-regulate the expression of AQP4, the differences had no statistical significance( $P>0.05$ ). **Conclusion** Midazolam is equally potent as propofol in ameliorating brain edema induced by I/R injury, and is a suitable sedative for such condition.

**【Key words】** midazolam; propofol; ischemia/reperfusion injury; brain edema; aquaporin

丙泊酚与咪达唑仑是公认对脑缺血再灌注损伤有保护作用的两种镇静药。目前对于两种药物脑保护效应的对比主要着眼于运动功能评分、神经元凋亡、脑梗死面积以及神经元的电镜下形态等方面<sup>[1-3]</sup>。关于两种药物哪种更有利于脑缺血再灌注后脑水肿的控制与治疗目前尚缺乏较深入的研究。近来研究发现,丙泊酚可以在离体星形胶质细胞缺氧-复氧模型中通过蛋白激酶 C 途径下调水通道蛋白 4(AQP4)的表达<sup>[4]</sup>,提示丙泊酚可以抑制脑缺血再灌注后的脑水肿。然而,咪达唑仑是否具有该功能目前尚无报道。本研究通过对比在大鼠脑局灶缺血再灌注后应用丙泊酚与咪达唑仑对脑水肿的影响,探讨两种药物哪种更适用于脑缺血-再灌注患者的镇静,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雄性 SD 大鼠 72 只(体质量 250~280 g,徐

州医学院实验动物中心提供)。实验前将大鼠置于 20℃ 室温、安静环境中饲养,实验前禁食 6 h。

**1.2 实验分组** 随机分为四组(脑缺血再灌注组、假手术组、丙泊酚处理组、咪达唑仑处理组),每组动物 6 只。脑缺血再灌注组采用 MCAO 模型,栓塞大脑中动脉 2 h 后恢复灌注;假手术组仅行分离手术,不栓塞大脑中动脉(上述两组手术方法见下条说明);丙泊酚处理组于恢复再灌注后选择行为学评分 1 分及以上者给予丙泊酚腹腔注射 100 mg/kg,2 次/天,共 3 次。咪达唑仑处理组:恢复再灌注后选择行为学评分 1 分及以上者给予咪达唑仑 10 mg/kg 腹腔注射,2 次/天,共 3 次。

**1.3 材料与试剂** MCAO 栓线购自北京沙东生物技术有限公司。免疫印迹用试剂盒采用碧云天生物技术公司。AQP4 二抗购自 Santa Cruz Biotechnology Incorporation。

**1.4 MCAO 模型的制备** 参照 Longa 等<sup>[5]</sup>的线栓法制作大

\* 基金项目:蚌埠医学院科研课题计划(byky13123)。

作者简介:徐进步,男,硕士,主治医师,主要从事重症医学专业。△ 通讯作者,E-mail:sqs003@126.com。

鼠大脑中动脉阻断模型动物饲养及手术室温控制于 25 ℃ 左右,术前 12 h 禁食不禁水,将大鼠以 10% 水合氯醛 35 kg/kg 腹腔注射麻醉,仰卧固定于手术台上,取颈正中切口,暴露右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,颈外动脉和颈总动脉近心端,于颈内动脉远心端备线,在颈总动脉近分叉处剪一约 0.2 mm 的 V 形切口,将直径为 0.26 mm 的头端包被多聚赖氨酸的尼龙线经该切口顺颈总动脉插入颈内动脉(18±1)mm,感到有轻微阻力时停止,使大脑中动脉起始部阻塞,扎紧备线并固定栓线,缝合皮肤切口 2 h 后,将栓线拔出约 10 mm 恢复再灌注。麻醉清醒后观察出现右侧 Horner 综合征,左侧前肢为主的活动障碍判为手术成功。再灌注 72 h 后进行行为学评分和取材行下一步实验,假手术组条件同上,置线栓深度为 10 mm,麻醉清醒后观察无右侧 Horner 综合征,左侧前肢为主的活动障碍为标准。

**1.5 行为学评分** 每组动物均于处死前进行行为学评分,评分标准参考 Longa 5 分制法<sup>[5]</sup>(0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:行走时向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失)。分值越高,说明动物行为障碍越严重。

**1.6 脑梗死灶体积测定**<sup>[6]</sup> 随机取各组 6 只动物过量麻醉后断头,将脑组织取出后置于-80 ℃ 冰箱快速冻冷 5 min,去除嗅球、小脑及低位脑干后由前向后冠状切 4 刀,片厚约 2 mm,置于 2% 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)磷酸缓冲液中,37 ℃ 避光孵育 30 min,显色完全后置 10% 甲醛溶液固定。因线粒体过氧化氢酶可氧化 TTC 故存活组织呈深红色,梗死组织不着色呈苍白色。染色后脑片经拍照后进行图像处理,计算梗死灶(苍白区)范围,将每一脑片的梗死面积乘以厚度(2 mm),再将各脑片数值相加后得到脑梗死灶体积的近似值,取脑梗死体积占全脑体积的百分比作为监测指标。

**1.7 脑含水量测定**<sup>[6]</sup> 各组随机选取 6 只大鼠,过量水合氯醛麻醉后迅速断头取脑,采用干湿重法于缺血侧及缺血对侧取视交叉前 2 mm 至视交叉后 2 mm 脑组织约 120 mg,包括皮质和白质,称取湿重后于 85 ℃ 烤箱中烘烤 72 h 至恒重后称取干重按 Elliott 公式,脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

**1.8 蛋白印迹(Western Blot)法测定脑组织的 AQP4 表达**<sup>[6]</sup> 余下 6 只动物过量水合氯醛麻醉后,迅速断头取脑,于冰面上分离切取右侧半球视交叉前 2 mm 至视交叉后 2 mm 脑组织液氮迅速冻冷-70 ℃ 保存待用。标本加入含苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液手动匀浆后超声破碎,经 4 ℃ 12 000 r/min 离心 1 h,上清液为胞浆蛋白成分。沉淀再加裂解液,重悬,4 ℃、24 000 r/min 离心 1 h,重复两次,上清液即为实验所需胞膜蛋白。测浓度后,蛋白煮沸变性,待用。制备 SDS-PAGE 凝胶,加样电泳,待溴酚蓝电泳至分离胶底部时结束电泳,采用半干转法转膜。转膜后将 NC 膜浸入含 10%TBST 的封闭液中,置于水平摇床上,室温封闭 4 h,将 NC 膜加入稀释的 AQP4 抗体及 β-actin 抗体中 4 ℃ 过夜,TBST 清洗 3 次,放入稀释好的碱性磷酸酶标记的二抗室温孵育 2 h。NBT-BCIP 显色试剂盒显色。所得蛋白条带扫描照片,以 Photoshop 软件进行灰度值分析,并按公式(相对值=各处理组条带灰度值/假手术组条带灰度值)计算相对灰度值。

**1.9 统计学处理** 使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用 ANOVA 分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 四组大鼠行为学评分比较** 假手术组行为较正常无变化,缺血再灌注组评分为(2.5±0.8)分,丙泊酚处理组为(1.3±0.5)分,咪达唑仑处理组为(1.3±1.0)分。丙泊酚处理组与咪达唑仑处理组两组行为学评分与假手术组、缺血再灌注组相比,差异有统计学意义  $P < 0.05$ ,丙泊酚处理组与咪达唑仑处理组两组间评分差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 四组大鼠梗死面积比较** 假手术组无梗死,缺血再灌注组梗死面积为(24.5±3.2)%,丙泊酚处理组梗死面积为(16.1±2.4)%,咪达唑仑处理组梗死面积为(18.7±4.2)%,丙泊酚处理组与咪达唑仑处理组两组梗死面积较缺血再灌注组明显降低( $P < 0.05$ ),两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 四组大鼠脑含水量测定** 丙泊酚与咪达唑仑均可以明显改善脑局灶缺血再灌注后脑水肿,两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

| 表 1 四组大鼠脑含水量测定( $\bar{x} \pm s$ , %) |          |                         |          |
|--------------------------------------|----------|-------------------------|----------|
| 组别                                   | <i>n</i> | 缺血侧                     | 对侧       |
| 假手术组                                 | 6        | 75.5±3.3                | 75.7±2.8 |
| 缺血再灌注组                               | 6        | 85.4±3.8                | 76.1±3.5 |
| 丙泊酚处理组                               | 6        | 79.8±2.6 <sup>ab</sup>  | 75.8±3.6 |
| 咪达唑仑处理组                              | 6        | 81.2±2.4 <sup>abc</sup> | 75.9±2.5 |

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与缺血组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与对侧比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 四组大鼠脑 AQP4 表达的影响** Western Blot 分析结果显示与假手术组相比,缺血再灌注组 AQP4 相对值为 2.28±0.28,丙泊酚处理组 AQP4 相对值为 1.44±0.19,与缺血再灌注组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );咪达唑仑处理组相对值为 1.60±0.20,与缺血再灌注组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。丙泊酚处理组与咪达唑仑处理组两组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

3 讨 论

缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中的病理生理学基础,缺血再灌注损伤过程中因为脑水肿导致颅内压升高造成脑疝是缺血性脑卒中患者死亡的重要原因,控制脑水肿也是该类患者早期临床治疗的方向。

脑水肿主要分为血管源性脑水肿与细胞毒性脑水肿。血管源性脑水肿是指由于血脑屏障损害导致其通透性增加造成的脑水肿,主要发生于创伤、肿瘤、炎症和低氧等情况;而细胞毒性脑水肿发生在血脑屏障完整的情况下,主要是由于脑细胞膜上钠钾泵的功能障碍,引发大量水分子进入脑细胞从而导致的脑水肿,主要发生于中毒、创伤、低氧等情况。在脑局灶缺血后主要发生的是细胞毒性脑水肿<sup>[8]</sup>。

反映脑水肿的指标除直接测定脑含水量外,还可以由通过 AQP 的表达变化来监测,其中 AQP4 是哺乳动物脑中调节水平衡的最主要的分子。AQP4 可以在短时间内通过磷酸化调节与细胞内分布调节来改变自身对水分子的通透性,也可以在较长时间内通过上调 AQP4 的表达来调节水分子的进出。在细胞毒性脑水肿,AQP4 通过表达上调造成细胞膜对水分子的通透性增加<sup>[9]</sup>。因此考察以细胞毒性脑水肿为主要特征的脑局灶缺血再灌注损伤时主要观察脑内 AQP4 表达的变化。既往研究显示在脑局灶缺血 1 h 后使用丙泊酚后处理可以明显减轻脑水肿,抑制 AQP4 的表达。其机制可能与基质金属蛋

白酶(MMP)的表达受抑制有关<sup>[10]</sup>。还有研究认为丙泊酚对细胞毒性脑水肿的缓解作用主要是在锌离子帮助下专属性抑制 AQP4 的结果<sup>[11]</sup>。

目前,对于咪达唑仑减轻脑水肿的效果尚缺乏实验研究。本研究通过与丙泊酚对照观察咪达唑仑对局灶脑缺血再灌注后脑水肿的影响,发现咪达唑仑与丙泊酚减轻脑水肿的作用无明显差别,提示咪达唑仑同样能够抑制缺血再灌注后脑水肿,且这种作用也是通过 AQP4 的表达下调实现的。咪达唑仑脑保护的机制认为一方面它通过作用于 GABAA 受体减轻谷氨酸堆积所致的神经中毒;另一方面它还能通过降低脑代谢率来改善脑的氧供需失衡<sup>[3]</sup>。而咪达唑仑通过什么途径调节 AQP4 的表达尚不清楚,其机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] 陈莲华,贡沁燕,俞彰,等. 丙泊酚、咪达唑仑和硫喷妥钠对大鼠局灶脑缺血再灌注的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2001,20(2):81-86.

[2] 孙永海,岳云,王云. 异丙酚和咪唑安定预处理对大鼠全脑缺血损伤的保护及递质机制[J]. 中风与神经疾病杂志,2005,22(4):344-347.

[3] Harman F, Hasturk AE, Yaman M, et al. Neuroprotective effects of propofol, thiopental, etomidate, and midazolam in fetal rat brain in ischemia-reperfusion model[J]. Childs Nerv Syst, 2012, 28(7):1055-1062.

[4] Zhu SM, Xiong XX, Zheng YY, et al. Propofol inhibits aquaporin 4 expression through a protein kinase C-de-

pendent pathway in an astrocyte model of cerebral ischemia/reoxygenation [J]. Anesth Analg, 2009, 109 (5): 1493-1499.

[5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.

[6] 丰浩荣,许鹏程,徐进步,等. 利多卡因预处理对大鼠脑缺血再灌注时水通道蛋白 4 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(13):1045-1049.

[7] 中华医学会神经病学分会. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南(2010) [J]. 中国临床医生, 2011, 39(11):68-74.

[8] Nag S, Manias JL, Stewart DJ. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema[J]. Acta Neuropathol, 2009, 118(2):197-217.

[9] 李敏,陈少军,陈学群,等. 脑水肿的 AQP4 调节机制研究进展[J]. 浙江大学学报:医学版, 2013, 42(1):114-122.

[10] Lee JH, Cui HS, Shin SK, et al. Effect of propofol post-treatment on blood-brain barrier integrity and cerebral edema after transient cerebral ischemia in rats[J]. Neurochemical Res, 2013, 38(11):2276-2286.

[11] Kato J, Hayashi MK, Aizu S, et al. A general anaesthetic propofol inhibits aquaporin-4 in the presence of Zn[J]. Biochem J, 2013, 454(2):275-282.

(收稿日期:2015-01-20 修回日期:2015-02-25)

(上接第 1833 页)

意义,在病原菌未明确的情况下,结合患者症状体征、病理类型既往用药史、在患者感染早期给予抗革兰阴性杆菌相关药物治疗<sup>[8]</sup>,选用哌拉西林/他唑巴坦及阿米卡星,尤其是亚胺培南、美罗培南作为治疗尘肺重症感染患者的首选用药<sup>[9]</sup>,但同时要认识到随着此类药物在临床的普遍应用,相继出现了关于革兰阴性杆菌对此类药物耐药的一些报道,王婧雯等<sup>[10]</sup>调查显示,对于一些下呼吸道感染的患者中,肺炎克雷伯菌及铜绿假单胞菌对于亚胺培南的耐药率可高达 72.8%和 100.0%,若出现此类情况,可选择阿米替星(如在本调查中主要的 3 种革兰阴性杆菌对阿米卡星耐药性较低)等作为亚胺培南及美罗培南的备选。本调查结果亦显示,铜绿假单胞菌是医院感染中最为常见细菌之一,且通常表现出多重耐药现象,在临床治疗中常发生突发性耐药情况,这也是导致其感染率居高不下的主要原因之一<sup>[11]</sup>,本研究中铜绿假单胞菌对碳青霉烯类亚胺培南及美罗培南、阿米卡星最敏感,其次氨基曲南及哌拉西林/他唑巴坦。革兰阳性球菌对第三及第四代头孢菌素类药物具有较高的耐药性,对替考拉宁、万古霉素具有较低的耐药性,其中金黄色葡萄球菌对替考拉宁、万古霉素未发现耐药菌株。

综上所述,尘肺病合并下呼吸道感染患者的主要病原菌为革兰阴性杆菌,且病原菌的耐药现象较为严重,临床给予持续耐药监测对于指导合理应用抗菌药物,提高治疗效果以及减缓耐药菌株的出现至关重要。

参考文献

[1] 张敏,王丹,郑迎东,等. 中国 1997 至 2009 年报告尘肺病发病特征和变化趋势[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,

2013,31(5):321-334.

[2] 文细毛,任南,吴安华,等. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2):350-355.

[3] 张庆年,钟茂耀,吴木生,等. 湛江市尘肺病死亡危险因素的研究分析[J]. 中国热带医学, 2012, 12(5):582-584, 587.

[4] 杨玉霞,栾斌,马丽娜. 2000~2010 年下呼吸道感染病原菌构成变迁及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(16):3509-3511.

[5] 蔡柏蔷. 呼吸内科诊疗常规[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:222-224.

[6] 陈本渊. 100 例下呼吸道感染患者的病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(16):3515-3516.

[7] 傅杰武,王蕊,牟逸晴. 下呼吸道感染患者病原菌分布及耐药性变迁[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(6):1017-1019.

[8] 李佳峰. 760 例下呼吸道病原菌分布及耐药性分析[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(6):1026-1027.

[9] 王峰,陈延军. 下呼吸道感染病原菌类型及耐药性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 11(6):561-563.

[10] 王婧雯,王磊,刘渝,等. 我院下呼吸道感染患者细菌分布及耐药性分析[J]. 中国药房, 2011, 10(10):896-898.

[11] 刘向欣,刘运秋,尹素凤. 呼吸内科下呼吸道感染患者病原菌构成及耐药性分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(14):3645-3648.

(收稿日期:2015-01-25 修回日期:2015-03-17)