

基于内质网应激诱导的自噬探讨右美托咪定联合瑞马唑仑延缓EAE模型小鼠疾病进程

印浩¹ 吴雯^{2*}

(¹凉山彝族自治州第一人民医院, 麻醉科, 西昌 615000; ²西昌市人民医院, 麻醉科, 西昌 615000)

摘要 该文探讨右美托咪定(Dex)联合瑞马唑仑(Rem)对脂多糖(LPS)诱导的BV2小胶质细胞损伤及实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型小鼠的影响和机制。体外实验采用LPS刺激BV2细胞构建炎症模型; 体内实验通过髓鞘MOG35-55免疫C57BL/6小鼠建立EAE模型。CCK8检测细胞活力, 细胞划痕和Transwell实验评估迁移侵袭能力, 流式细胞术分析凋亡率, ELISA检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)/白细胞介素-6(IL-6)/肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 共聚焦显微镜和Western blot检测内质网应激标志物免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip)/CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)/磷酸化内质网应激传感器肌醇需求酶1 α (IRE1 α)与自噬蛋白微管相关蛋白1轻链3II/I(LC3II/I)、PTEN诱导激酶1(PINK1)、帕金蛋白(Parkin)、隔离体蛋白1(p62)、贝林蛋白1(Beclin1)表达情况, 并采用HE/LFB/TUNEL染色评估脊髓组织病理、脱髓鞘及凋亡情况。Dex单药在9 μ mol/L显著提升细胞活力($P<0.001$), 而联合Rem(90 μ g/mL)后细胞活力进一步升高($P<0.01$); Dex+Rem组细胞愈合($P<0.01$)与侵袭能力较Dex和Rem组提升($P<0.05$)。与LPS2组相比, Dex+Rem2组细胞凋亡率降低($P<0.001$), 炎症因子(IL-1 β /IL-6/TNF- α)释放减少($P<0.001$), 内质网应激蛋白(Bip/CHOP/IRE1 α)表达下调($P<0.001$), 自噬流激活(LC3II/I、PINK1、Parkin、Beclin1蛋白表达水平上升, p62蛋白表达水平下降)($P<0.001$)。而Tun可逆转以上所有过程。体内实验中, Dex+Rem3组较Model组显著提高EAE小鼠神经功能评分($P<0.01$), 减少脊髓神经元凋亡及减轻脱髓鞘, 并同步抑制脊髓组织内质网应激蛋白Bip/CHOP/IRE1 α 的表达和促进自噬(LC3II/I、Beclin1蛋白表达水平上升, p62蛋白表达水平下降)($P<0.001$)。右美托咪定联合瑞马唑仑通过协同抑制内质网应激、激活自噬及减轻炎症反应, 有效减轻了LPS诱导的细胞损伤和延缓了EAE模型神经病理进程, 为多发性硬化症的临床治疗提供了新策略。

关键词 右美托咪定联合瑞马唑仑; 自噬; 内质网应激; 实验性自身免疫性脑脊髓炎

Investigating the Alleviation of Disease Progression in EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) Model Mice by Dexmedetomidine Combined with Remimazolam via Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Autophagy

YIN Hao¹, WU Wen^{2*}

(¹Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang 615000, China;

²Department of Anesthesiology, Xichang People's Hospital, Xichang 615000, China)

收稿日期: 2025-08-29 接受日期: 2025-10-21

2023年四川省医学重点学科(实验室、专科)立项项目(批准号: 23PJ352)和西昌市科技项目(批准号: ZDXM-2023-03)资助的课题

*通信作者: Tel: 18349672597, E-mail: wuwen009@163.com

Received: August 29, 2025 Accepted: October 21, 2025

This work was supported by the Key Medical Discipline (Laboratory, Specialty) Project Approved in Sichuan Province in 2023 (Grant No.23PJ352) and the Science and Technology Project of Xichang City (Grant No.ZDXM-2023-03)

*Corresponding author. Tel: +86-18349672597, E-mail: wuwen009@163.com

Abstract This study was to investigate the neuroprotective effects and mechanisms of Dex (dexmedetomidine) combined with Rem (remimazolam) on LPS (lipopolysaccharide)-induced BV2 microglial cell injury and EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) model mice. *In vitro*, LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) was used to stimulate BV2 cells to establish an inflammatory model. *In vivo*, an EAE model was established in C57BL/6 mice immunized with MOG35-55. Cell viability was detected by CCK8 assay; migration and invasion capabilities were evaluated by scratch wound healing and Transwell assays; apoptosis rate and inflammatory factors [IL-1 β (interleukin-1 β)/IL-6/TNF- α (tumor necrosis factor- α)] were analyzed by flow cytometry and ELISA; endoplasmic reticulum stress markers [Bip (immunoglobulin heavy chain-binding protein)/CHOP (CCAAT enhancer binding protein homologous protein)/IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α)] and autophagy-related proteins [LC3II/I (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I), PINK1 (PTEN-induced kinase 1), Parkin, p62 (sequestosome 1), Beclin1] were examined by confocal microscopy and Western blot; and spinal cord histopathology, demyelination, and apoptosis were assessed by HE (hematoxylin-eosin), LFB, and TUNEL staining. Dex monotherapy at 9 $\mu\text{mol/L}$ significantly increased cell viability ($P<0.001$), and combination with Rem (90 $\mu\text{g/mL}$) further enhanced viability ($P<0.01$). The Dex+Rem group showed improved cell wound healing ($P<0.01$) and invasion capacity ($P<0.05$) compared with the Dex or Rem alone groups. Compared with the LPS group, the Dex+Rem group exhibited a reduced apoptosis rate ($P<0.001$), decreased release of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, TNF- α ; $P<0.001$), downregulated expression of endoplasmic reticulum stress proteins (Bip, CHOP, IRE1 α ; $P<0.001$), and activated autophagy flux (increased protein expression of LC3II/I, PINK1, Parkin, Beclin1, and decreased p62 expression; $P<0.001$). Tun (Tunicamycin) reversed all these processes. *In vivo*, compared with the Model group, the Dex+Rem group significantly improved the neurological function score in EAE mice ($P<0.01$), alleviated spinal cord neuronal apoptosis and demyelination, concurrently inhibited the expression of spinal cord endoplasmic reticulum stress proteins (Bip, CHOP, IRE1 α), and promoted autophagy (increased LC3II/I and Beclin1 protein expression, decreased p62 expression; $P<0.001$). The combination of dexmedetomidine and remimazolam effectively mitigates LPS-induced cellular damage and delays the neuropathological progression in the EAE model by synergistically inhibiting endoplasmic reticulum stress, activating autophagy, and reducing inflammation. This combination provides a novel strategy for the clinical treatment of multiple sclerosis.

Keywords dexmedetomidine combined with remimazolam; autophagy; endoplasmic reticulum stress; experimental autoimmune encephalomyelitis

多发性硬化症是一种以中枢神经系统脱髓鞘和神经炎症为特征的慢性自身免疫性疾病,全球约230万患者面临复发与残疾风险^[1]。当前疾病药物如奥扎莫德虽可通过调节鞘氨醇-1-磷酸受体降低年复发率48%并延缓脑萎缩,但仍无法完全阻断神经退行性进程^[2]。近年研究表明,内质网应激在多发性硬化症及其动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)中驱动神经元损伤的核心机制日益明确^[3]。内质网应激主要通过3个跨膜传感器[肌醇需求酶1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)、PERK和ATF6]传递信号。其中,IRE1 α 通路因其能够直接调控炎症和免疫相关基因的转录,并在小胶质细胞/巨噬细胞激活中发挥关键作用,而被认为是连接内质网应激与神经炎症的

核心枢纽^[4]。EAE模型中脊髓组织内质网应激标志物免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chain-binding protein, Bip)、IRE1 α 及CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT enhancer binding protein homologous protein, CHOP)显著升高,通过激活未折叠蛋白反应触发炎症信号通路,最终导致线粒体途径凋亡^[5]。而自噬作为细胞内清除异常蛋白和受损细胞器的关键过程,在多发性硬化症中通过自噬减弱硝化PTEN诱导激酶1(PTEN-induced kinase 1, PINK1)/帕金森蛋白(Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin)通路,加剧神经元线粒体清除障碍与氧化应激,加速神经退行性变^[6];值得注意的是,内质网应激与自噬交互失调形成恶性循环,ERS抑制自噬流导致自噬衔接蛋白p62累积及微管相关蛋白1轻链3II(microtubule-

associated protein 1 light chain 3 II, LC3II)/LC3I值下降或者无变化, 进一步加重未折叠蛋白负荷并促进小胶质细胞介导的神经炎症级联反应^[7]。

在药物干预策略上, 右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)作为高选择性 α_2 -肾上腺素受体激动剂, 可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶信号抑制核因子 κ B磷酸化, 减少肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6等促炎因子释放^[8]。而新型苯二氮草类药物瑞马唑仑(remimazolam, Rem)作为 γ -氨基丁酸A型受体调节剂^[9], 其在多发性硬化症/EAE模型中调控内质网应激-自噬轴的作用尚未明确。鉴于Dex与Rem分别通过不同受体与信号通路发挥抗炎与细胞保护作用, 二者在作用机制上具有互补潜力: Dex侧重于抑制炎症信号转导, 而Rem则可能通过调节神经递质受体影响内质网应激及自噬过程。因此, 我们推测联合应用Dex与Rem可能通过协同调控内质网-PINK1/Parkin介导的自噬, 调节脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激的小胶质细胞内质网应激-自噬失衡, 从而更有效地减轻神经炎症与减少细胞凋亡。鉴于此, 本研究首次提出Dex与Rem联合应用可通过协同调控内质网-PINK1/Parkin介导的自噬和减轻LPS诱导的小胶质细胞的内质网应激-自噬失衡, 从而减轻神经炎症与减少细胞凋亡, 为缓解EAE模型脱髓鞘病变及神经功能缺损提供新型联合治疗策略, 同时为多发性硬化症的临床药物开发提供实验性依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

CCK8试剂(货号: CK04)购自日本Dojindo Molecular Technologies公司; 右美托咪定(货号: D217)、瑞马唑仑(货号: SML2328)、脂多糖(货号: L2880)、衣霉素(货号: T7765)、弗氏完全佐剂(货号: F5881)、曲拉通-100(货号: T9284)购自美国Sigma-Aldrich公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: 556547)、结核菌素(货号: 231141)购自美国BD Biosciences公司; 一抗Bip(货号: 3177)、CHOP(货号: 2895)、IRE1 α (货号: 3294)、LC3II(货号: 2775)及Sequestosome-1/p62(货号: 5114)、Beclin1(货号: 3495)均购自美国Cell Signaling Technology公司; 一抗PINK1(货号: BC100-494)及Parkin(货号: ab77924)购

自英国Abcam公司; 小鼠IL-1 β ELISA检测试剂盒(货号: 900-K91)及TNF- α ELISA检测试剂盒(货号: 900-K25)购自美国PeproTech公司; IL-6 ELISA检测试剂盒(货号: ELSHIL06)购自武汉弗尔博生物科技有限公司; MOG35-55(货号: M407296)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 百日咳毒素(货号: 180)购自上海懋康生物科技有限公司。

1.2 细胞来源

小鼠小胶质细胞BV2(货号: CL-0493)购自武汉普诺赛生物技术有限公司。BV2细胞在补充有10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中培养。所有细胞类型均在5% CO₂、37 °C的培养箱中培养, 并定期传代以确保最佳生长和活力。

1.3 CCK8

将BV2细胞置于96孔板中, 细胞密度为 1×10^6 /孔。根据实验目的将这部分实验分为Control-0、LPS-0(1 μ g/mL)、LPS+Dex(1 μ mol/L、3 μ mol/L、6 μ mol/L、9 μ mol/L、12 μ mol/L^[10]), 待确定右美托咪定剂量后, 再探讨瑞马唑仑剂量。根据实验目的将这部分实验分为Control-0、LPS-0、LPS+Dex(9 μ mol/L)+Rem(30 μ g/mL、60 μ g/mL、90 μ g/mL、120 μ g/mL^[11])设置复孔每组6个, 使用移液器将细胞均匀铺入孔中, 每孔含细胞100 μ L。在将Dex和Rem加入培养基之后继续于37 °C培养箱中孵育持续24 h, 实验结束; 待实验结束后, 每孔加入10 μ L CCK8试剂, 孵育1~4 h, 使用酶标仪检测各孔在450 nm波长处的吸光度(D)值。

1.4 细胞实验分组

根据CCK8实验确定剂量, 分为细胞实验一: Control(无任何处理)、LPS(1 μ g/mL, 细胞贴壁后加入药物持续刺激12 h进行造模)、LPS+Dex(1 μ g/mL+9 μ mol/L, 造模结束后加入Dex持续孵育24 h)、LPS+Rem(1 μ g/mL+90 μ g/mL, 造模结束后加入Rem持续孵育24 h)、LPS+Dex+Rem(1 μ g/mL+9 μ mol/L+90 μ g/mL, 造模结束后加入Dex+Rem持续孵育24 h)。以上均在37 °C培养箱中持续孵育。

细胞实验二: Control2(无任何处理)、LPS2(1 μ g/mL, 细胞贴壁后加入持续刺激12 h)、LPS+Dex+Rem2(1 μ g/mL+9 μ mol/L+90 μ g/mL, 造模结束后加入Dex+Rem在37 °C培养箱孵育24 h)、Tun(细胞不做任何处理, 待贴壁后加入0.5 μ g/mL内质网应激激活剂衣霉素(Tunicamycin)^[12])、Dex+Rem+Tun(细胞贴壁后加入Tunicamycin持续12 h刺激, 再加入9 μ mol/L

Dex+90 $\mu\text{g/mL}$ Rem持续刺激24 h)。

1.5 流式细胞术

待实验结束后,将细胞实验二中各组细胞使用不含EDTA的胰酶在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中消化3 min,采用Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡,每管取100 μL 细胞悬液,加入5 μL Annexin V-FITC室温避光孵育15 min后,再加入10 μL PI染液孵育5 min,上机检测。

1.6 划痕实验

按照细胞实验一,实验前将细胞以密度 6×10^5 /孔接种于6孔板中,待细胞融合度达到90%以上时,于6孔板底部划出均匀的直线划痕。更换为无血清或低血清培养基以减少细胞增殖对迁移的影响。将培养皿置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,于0 h和24 h等时间点在倒置显微镜下相同位置拍照记录,数据分析时计算划痕愈合率(%)=[(初始划痕面积-某时间点划痕面积)/初始划痕面积] $\times 100\%$,实验需设置至少3个复孔并重复3次以保证结果可靠性。

1.7 Transwell实验

按照细胞实验一,实验前将Transwell小室置于24孔板中,上室加入200 μL 无血清培养基重悬的细胞悬液,下室加入600 μL 含10%胎牛血清的培养基作为化学引诱剂。将接种细胞的Transwell板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h后,取出小室用PBS轻柔漂洗,棉签擦拭上室膜表面未迁移细胞,4%多聚甲醛室温固定30 min,0.1%结晶紫染色20 min。于倒置显微镜下随机选取5个视野计数膜下表面迁移细胞数,实验需设置3个复孔并重复3次独立实验。

1.8 ELISA实验

按照细胞实验二,收集细胞上清。按照试剂盒说明书进行操作,使用酶联检测仪测定吸光度(D)值。

1.9 内质网应激测量

按照细胞实验二分组,当达到80%汇合时,将细胞与Mito-Tracker Green和ER-Tracker Red在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育35 min。所有程序均按照说明书进行。为了评估ER复合物,使用共聚焦显微镜捕获细胞。

1.10 动物来源和分组

1.10.1 动物来源和饲养 使用50只6~8周龄的C57BL/6J小鼠进行动物实验进行研究。所有小鼠均购买自南方模式生物科技股份有限公司,生产许可证号:C57BL/6J-A-008。所有动物饲养于SPF级屏障环境内,湿度为50%~60%,室温为(22 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,12 h/12 h,明暗间断照明,自由饮水和摄食。本研究

所有动物实验经西昌市人民医院伦理委员会审核并批准(批准号:2023-007)。

1.10.2 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型建立 将MOG35-55溶解在盐水中至终浓度为1 mg/mL,结核菌素溶解在弗氏完全佐剂中,形成1 mg/mL溶液。在脊柱的4个部位皮下注射0.1 mL这种溶液,将免疫日标记为第0天。在免疫当天腹腔注射300 ng百日咳毒素(溶解在无菌PBS中),待48 h后再次增强免疫反应。通过 CO_2 窒息法处死小鼠,并收集腰椎第5脊髓进行后续实验分析^[13]。

1.10.3 建模成功的标准 每只小鼠继续被饲养在无病原体的单笼环境中,并随意饮食。第二次百日咳毒素注射后的第4天开始监测疾病症状,根据疾病严重程度对小鼠进行评分,从0(无症状)到5(死亡),如下所示:1级,尾部无力或蹒跚步态;2级,尾部无力或蹒跚步态伴尾部无力(共济失调);2.5级:共济失调伴单肢部分瘫痪;3级:单肢完全瘫痪;3.5级:单侧肢体完全瘫痪,另一肢部分瘫痪;4级:双肢完全瘫痪;4.5级:四肢瘫痪;5级:死亡。如果条件不包括死亡,则成功建模^[13]。

1.10.4 分组 共50只小鼠,使用12只作为Control3组:不做任何处理,此外使用剩余38只小鼠进行造模,其中造模成功36只,将造模成功小鼠分为Model组:按照以上进行造模;Dex+Rem3组:造模后灌胃给药24天,剂量50 $\mu\text{g/kg}$ Dex^[14]+15mg/kg Rem^[15];Ame组:阳性药组,造模后灌胃给药1.5 mg/kg Amethopterin 24天^[16]。

1.11 苏木精-伊红染色(HE staining)

将小鼠腰椎5脊髓组织使用石蜡包埋组织切片脱蜡至水,依次置于二甲苯I、II中、梯度酒精水化,蒸馏水冲洗;苏木精染色,流水冲洗返蓝,再次流水冲洗返蓝;0.5%伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。最后置于显微镜下观察拍照。

1.12 LFB(luxol fast blue)实验

对于LFB染色,使用0.1% LFB溶液对切片进行染色,并在60 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3 h,在室温下用0.1%甲酚紫溶液复染10 min,并用蒸馏水彻底洗涤。在通过分级酒精系列脱水并在二甲苯中清除后,使用Entellan安装切片以评估脱髓鞘程度。

1.13 Tunel染色

取经4%多聚甲醛室温固定30 min后的样本,PBS洗涤3次(每次5 min),曲拉通-100通透处理10 min;

PBS冲洗后滴加Tunel反应混合液(含TdT酶与荧光标记dUTP), 37 °C避光孵育60 min; PBS充分洗涤3次, DAPI染核5 min(避光), 抗荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦显微镜双通道采集图像。

1.14 Western blot实验

取样本, 使用RIPA解液提取蛋白。将提取好的蛋白使用BCA法进行蛋白定量、变性。电泳、切胶, 转膜。待转膜结束后, 室温封闭2 h。加入一抗内质网应激相关蛋白Bip(1:1 500)、CHOP(1:1 500)、IRE1 α (1:1 500)和自噬相关蛋白LC3II/LC3I(1:1 000)、PINK1(1:1 000)、Parkin(1:1 000)、p62(1:1 000)、Beclin1(1:1 000), 4 °C冰箱摇床过夜。待第2天, 回收抗体, 将条带使用PBST清洗3次每次10 min。加入二抗(1:5 000), 室温孵育2 h。孵育结束, 使用PBST清洗3次, 每次10 min。清洗结束后, 滴加超敏ECL发光液, 使用曝光机进行曝光。

1.15 透射电子显微镜

收集小鼠腰椎5脊髓组织在4 °C切成约1 mm×1 mm×1 mm的小块后立即用2.5%戊二醛室温固定2 h, 洗涤30 min, 重固定2 h, 用磷酸盐缓冲液重洗10 min, 在乙醇中梯度脱水, 用乙酸铀酰染色2 h或过夜, 脱水, 用环氧丙烷置换10 min, 包埋在环氧树脂中, 切成1~2 μ m的切片, 最后用亚甲基染色。接下来, 使用瑞典LKB-V超微切片机将样品切成50~70 nm的超薄切片, 并用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色, 以便使用电子透射显微镜进行观察和拍摄。

1.16 统计与分析

使用SPSS26.0进行数据分析。所有数据经正态性和方差齐性检验后若 $P>0.05$, 则满足以上条件。使用单因素方差分析分析三组及以上的数据, 若 $P<0.05$, 则数据具有显著性, 可以进行事后两两比较, 使用Turkey HSD进行该检验, 若 $P<0.05$, 则数据具有显著性。对于两组数据, 则使用独立 t 检验进行数据分析。

2 结果

2.1 右美托咪定联合瑞马唑仑促进细胞增殖

首先, 使用CCK8实验研究右美托咪定在LPS处理下对BV2细胞活力的影响(图1A)。实验结果表明, 与Control-0组相比, LPS-0显著抑制细胞增殖($P<0.001$); 与LPS-0组相比, LPS+Dex(6 μ mol/L、9 μ mol/L)时细胞活力显著上升($P<0.01$, $P<0.001$), 而在12 μ mol/L Dex时

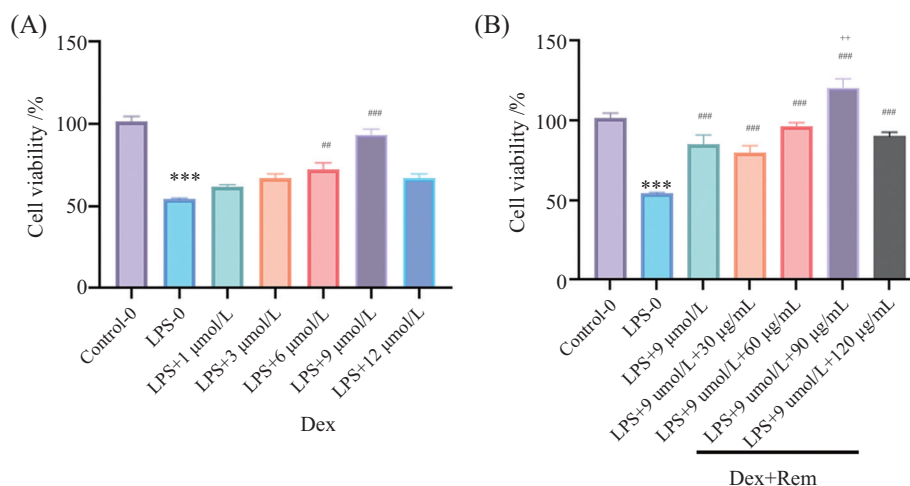
细胞活力下降。故而, 对于右美托咪定使用9 μ mol/L进行后续实验。继续使用CCK8研究右美托咪定和瑞马唑仑联合应用对细胞活力的影响, 实验结果表明, 与Control-0组相比, LPS-0组细胞活力显著下降($P<0.001$); 与LPS-0组相比, Dex在LPS+9 μ mol/L组时细胞活力显著上升($P<0.001$); 当加入瑞马唑仑后, 与LPS-0组相比, Dex+Rem在9 μ mol/L+30 μ g/mL、9 μ mol/L+30 μ g/mL、9 μ mol/L+60 μ g/mL、9 μ mol/L+90 μ g/mL、9 μ mol/L+120 μ g/mL时细胞活力均显著上升($P<0.001$)(图1B)。与LPS+9 μ mol/L组相比, LPS+9 μ mol/L+90 μ g/mL细胞活力显著上升($P<0.01$)(图1B), 表明右美托咪定联合瑞马唑仑相比右美托咪定单独使用可以有效促进细胞增殖。

2.2 右美托咪定联合瑞马唑仑对细胞愈合能力和侵袭的影响

使用细胞划痕实验验证右美托咪定、瑞马唑仑、右美托咪定联合瑞马唑仑对细胞愈合能力的影响(图2A)。实验证明, 与Control组相比, LPS组细胞愈合能力显著下降($P<0.001$); 与LPS组相比, LPS+Dex和LPS+Rem组细胞愈合能力显著上升($P<0.001$); 与LPS+Dex和LPS+Rem组相比, LPS+Dex+Rem组细胞愈合能力显著上升($P<0.01$)。使用Tranwell实验验证右美托咪定、瑞马唑仑、右美托咪定联合瑞马唑仑对细胞愈合能力的影响(图2B)。实验证明, 与Control组相比, LPS组细胞侵袭能力显著下降($P<0.001$); 与LPS组相比, LPS+Dex和LPS+Rem组细胞侵袭能力显著上升($P<0.001$); 与LPS+Dex和LPS+Rem组相比, LPS+Dex+Rem组细胞侵袭能力显著上升($P<0.05$)。

2.3 右美托咪定联合瑞马唑仑通过抑制内质网应激抑制炎症因子产生发挥BV2细胞保护作用

使用流式细胞术检测右美托咪定联合瑞马唑仑对细胞凋亡的影响(图3A)。结果表明, 与Control2组相比, LPS2组细胞凋亡率显著上升($P<0.001$); 与LPS2组相比, LPS+Dex+Rem组细胞凋亡率显著下降($P<0.001$); 与Tun组相比, Tun+Dex+Rem组细胞凋亡率显著下降($P<0.001$)。使用ELISA验证右美托咪定联合瑞马唑仑对炎症因子的影响(图3B)。结果表明, 与Control2组相比, LPS2组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子显著上升(P 均 <0.001); 与LPS2组相比, LPS+Dex+Rem组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子显著下降(P 均 <0.001); 与Tun组相比, Tun+Dex+Rem

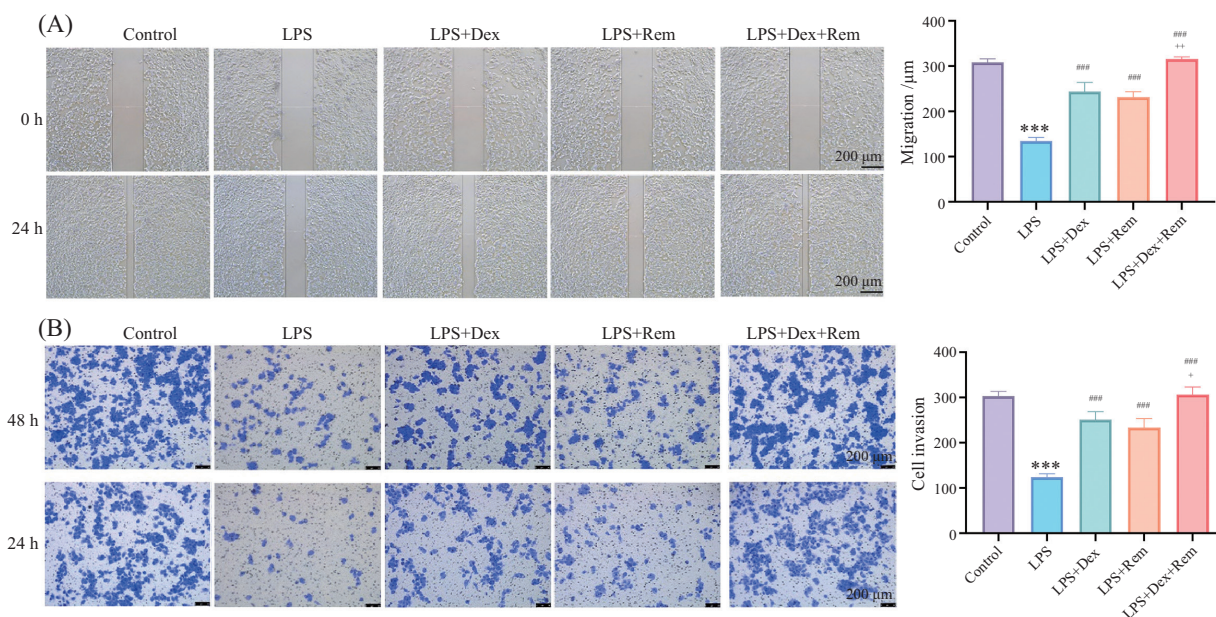


A: 右美托咪定单独使用对LPS诱导的细胞活力的影响; B: 右美托咪定和瑞马唑仑联合使用对LPS诱导的细胞活力的影响; *** $P<0.001$, 与Control-0组比较; # $P<0.01$, ### $P<0.001$, 与LPS-0组比较; ++ $P<0.01$, 与LPS+9 μmol/L组比较。

A: effects of dexmedetomidine alone on LPS-induced cell viability; B: effects of the combination of dexmedetomidine and remimazolam on LPS-induced cell viability. *** $P<0.001$ compared with Control-0 group; # $P<0.01$, ### $P<0.001$ compared with LPS-0 group; ++ $P<0.01$ compared with LPS+9 μmol/L group.

图1 右美托咪定联合瑞马唑仑促进BV2细胞增殖

Fig.1 Dexmedetomidine combined with remimazolam promotes proliferation of BV2 cells



A: 细胞愈合能力和统计图; B: Transwell实验和统计图; *** $P<0.001$, 与Control组比较; ### $P<0.001$, 与LPS组比较; + $P<0.05$, ++ $P<0.01$, 与LPS+Dex或LPS+Rem组比较。

A: cell migration ability and statistical graph; B: Transwell assay and statistical graph. *** $P<0.001$ compared with Control group; ### $P<0.001$ compared with LPS group; + $P<0.05$, ++ $P<0.01$ compared with LPS+Dex or LPS+Rem groups.

图2 右美托咪定联合瑞马唑仑对BV2细胞愈合能力和侵袭的影响

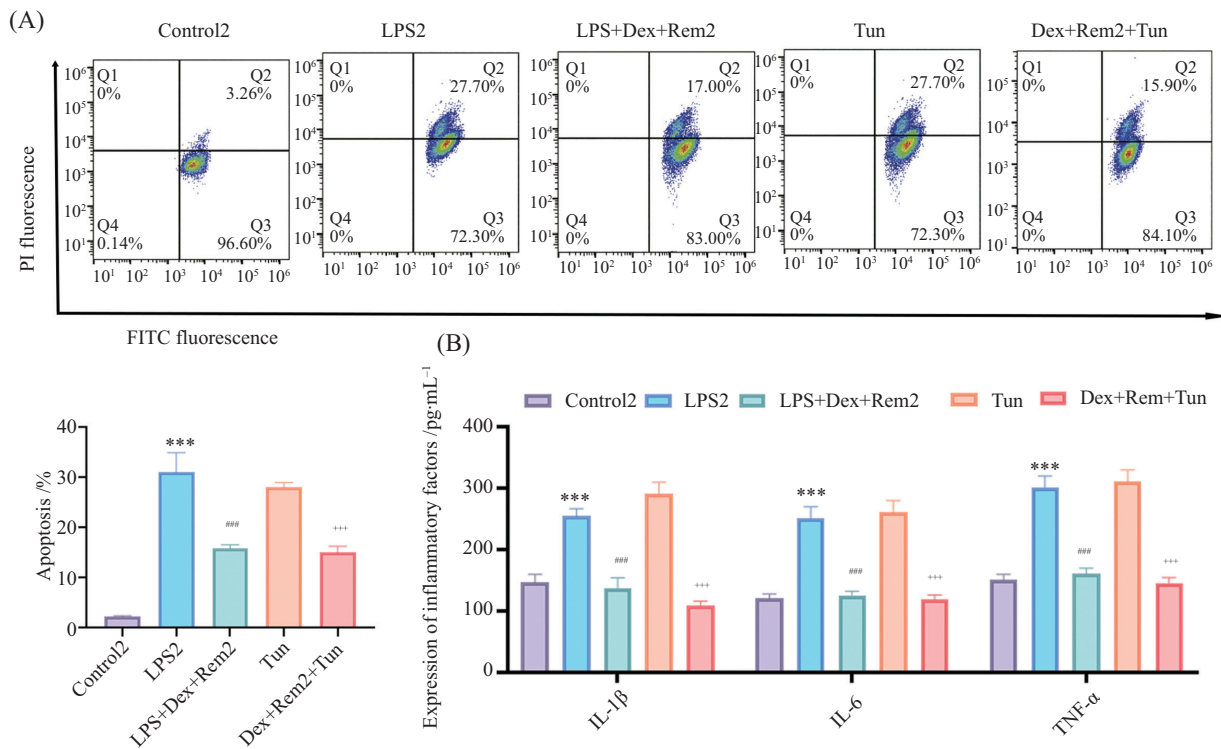
Fig.2 Effects of dexmedetomidine combined with remimazolam on migration and invasion capabilities of BV2 cells

组IL-1β、IL-6、TNF-α炎症因子水平显著下降(P 均<0.001)。

2.5 右美托咪定联合瑞马唑仑通过抑制内质网应激促进自噬发挥细胞保护作用

使用共聚焦显微镜观察右美托咪定联合瑞马

唑仑对内质网应激的影响(图4A)。结果表明,与Control2组相比, LPS2组荧光强度显著增强;与LPS2组相比, LPS+Dex+Rem组荧光强度降低;与Tun组相比, Tun+Dex+Rem荧光强度降低。使用 Western blot检测内质网应激相关蛋白(Bip、CHOP、IRE1α)和自噬



A: 流式细胞术和统计图; B: ELISA检测IL-1β、IL-6、TNF-α炎症因子统计图; *** $P < 0.001$, 与Control2组比较; ### $P < 0.001$, 与LPS2组比较; +++ $P < 0.001$, 与Tun组比较。

A: flow cytometry results and statistical graph; B: statistical graphs of IL-1β, IL-6, and TNF-α inflammatory factors measured by ELISA. *** $P < 0.001$ compared with Control2 group; ### $P < 0.001$ compared with LPS2 group; +++ $P < 0.001$ compared with Tun group.

图3 右美托咪定联合瑞马唑仑通过抑制内质网应激抑制炎症因子产生发挥细胞保护作用

Fig.3 Dexmedetomidine combined with remimazolam exerts cytoprotective effects by suppressing endoplasmic reticulum stress and inhibiting inflammatory factor production

相关蛋白(LC3II/LC3I、PINK1、Parkin、p62、Beclin1)表达情况。结果表明,与Control2相比,LPS2组内质网应激相关蛋白Bip、CHOP、IRE1α表达水平均显著上升($P < 0.001$),自噬相关蛋白LC3II/LC3I、PINK1、Parkin、Beclin1无变化,p62表达水平显著上升($P < 0.001$);与LPS2组相比,LPS+Dex+Rem组内质网应激相关蛋白Bip、CHOP、IRE1α表达水平均显著下降($P < 0.001$),自噬相关蛋白LC3II/LC3I、PINK1、Parkin、Beclin1表达水平显著上升($P < 0.001$),p62水平显著下降($P < 0.001$);与Tun组相比,Tun+Dex+Rem组内质网应激相关蛋白Bip($P < 0.01$)、CHOP($P < 0.001$)、IRE1α($P < 0.001$)表达水平均显著下降,自噬相关蛋白LC3II/LC3I($P < 0.001$)、PINK1($P < 0.001$)、Parkin($P < 0.001$)、Beclin1($P < 0.01$)水平显著上升($P < 0.001$),p62水平显著下降($P < 0.001$)。

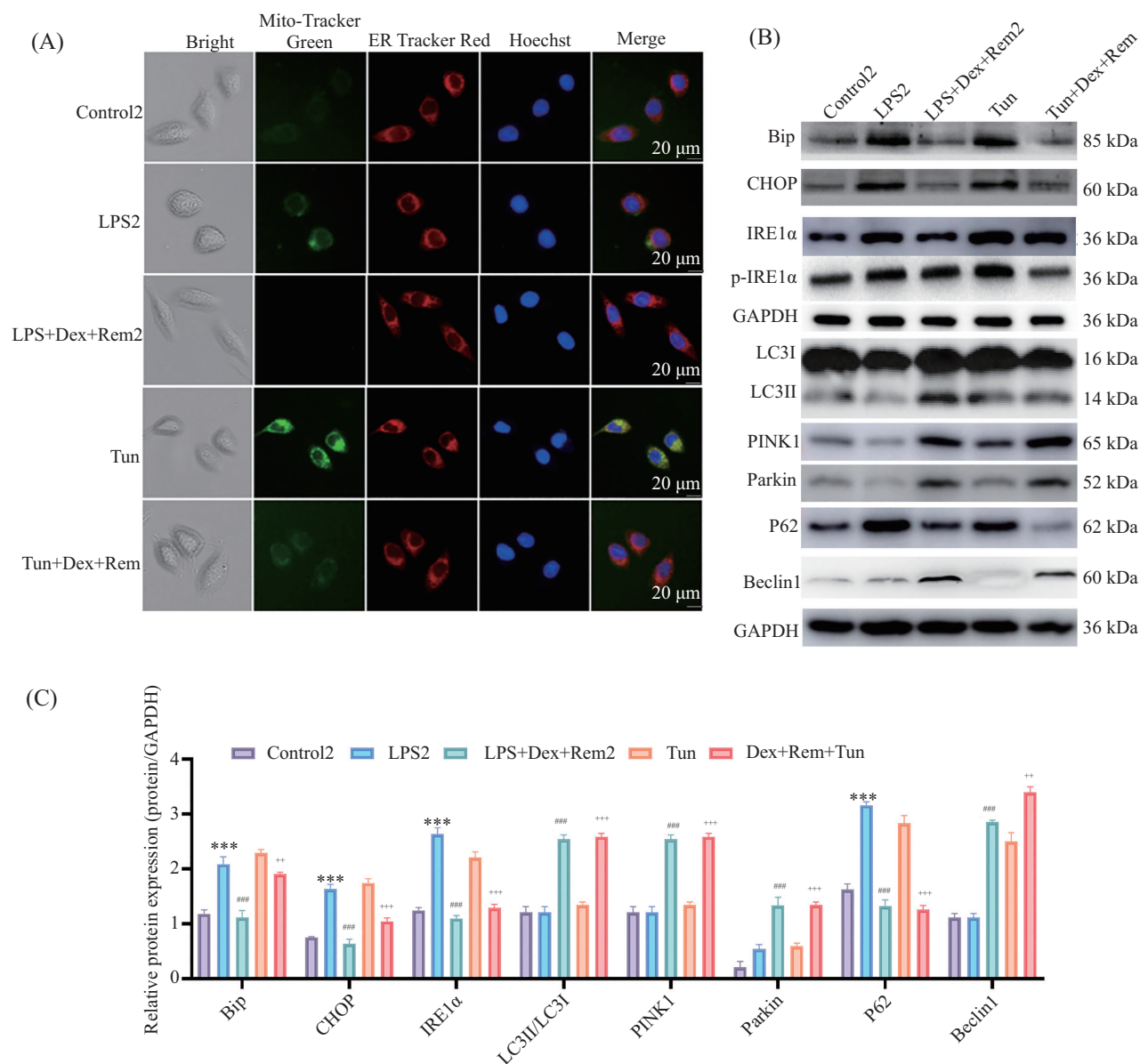
2.6 右美托咪定联合瑞马唑仑延缓实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠疾病进程

使用HE染色、LFB、Tunel染色检测脊髓组织

病理损伤、细胞凋亡和脱髓鞘情况(图5A~图5C)。结果表明,Model组的脊髓组织有许多神经元,细胞核染色较深,TUNEL阳性细胞数量增加,LFB染色表现出更少的脱髓鞘。而Control3组、Dex+Rem3组、Ame组的脊髓组织则表现出更健康的神经细胞,萎缩或深度染色的细胞核更少,TUNEL阳性细胞的计数显著降低。LFB染色突出了更广泛的脱髓鞘。EAE小鼠行为症状评分显示,与Control3组相比,Model组病理评分显著升高($P < 0.001$);与Model组相比,Dex+Rem3组病理评分显著降低($P < 0.01$)。

2.7 右美托咪定联合瑞马唑仑通过抑制内质网应激促进自噬延缓实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠疾病进展

使用Western blot检测内质网应激相关蛋白(Bip、CHOP、IRE1α)和自噬相关蛋白(LC3II/LC3I、PINK1、Parkin、p62、Beclin1)表达情况。结果表明,与Control3相比,Model组内质网应激相关蛋白Bip、CHOP、IRE1α表达水平均显著上升($P < 0.001$),自噬



A: 内质网应激荧光图; B: 内质网应激和自噬蛋白条带图; C: 内质网应激和自噬蛋白统计图; *** $P < 0.001$, 与Control2组比较; ### $P < 0.001$, 与LPS2组比较; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$, 与Tun组比较。

A: fluorescence images of endoplasmic reticulum stress; B: Western blot bands of endoplasmic reticulum stress and autophagy-related proteins; C: statistical graphs of endoplasmic reticulum stress and autophagy-related proteins. *** $P < 0.001$ compared with Control2 group; ### $P < 0.001$ compared with LPS2 group; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ compared with Tun group.

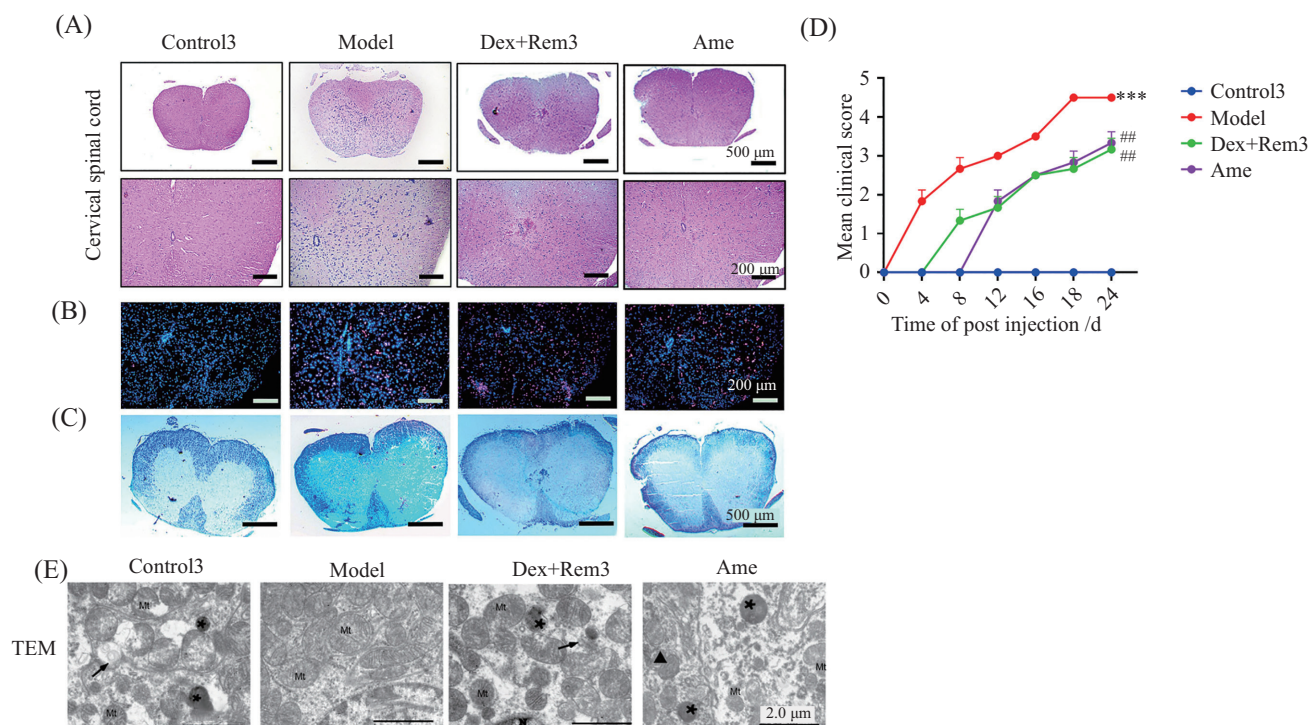
图4 右美托咪定联合瑞马唑仑通过抑制内质网应激促进自噬发挥细胞保护作用

Fig.4 Dexmedetomidine combined with remimazolam exerts cytoprotective effects by suppressing endoplasmic reticulum stress and promoting autophagy

相关蛋白LC3II/LC3I、PINK1、Parkin、Beclin1无变化, p62表达水平显著上升($P < 0.001$); 与Model组相比, Dex+Rem3组和Ame组内质网应激相关蛋白Bip、CHOP、IRE1α表达水平平均显著下降($P < 0.001$), 自噬相关蛋白LC3II/LC3I、PINK1、Parkin、Beclin1表达水平显著上升($P < 0.001$), p62水平显著下降($P < 0.001$)。

3 讨论

本研究通过体内外实验证实, 右美托咪定联合瑞马唑仑可显著减轻脂多糖LPS诱导的小胶质细胞损伤和延缓EAE模型的多发性硬化症病理进展^[1]。多发性硬化症作为一种中枢神经系统脱髓鞘疾病, 其核心病理特征包括免疫介导的髓鞘破坏、少突胶质细胞凋亡及轴突损伤, 最终导致不可逆的神经功



A: HE染色图; B: TUNEL染色图; C: LFB染色图; D: EAE模型小鼠病理评分; E: 透射电子显微镜图。*** $P < 0.001$, 与Control3组比较; ## $P < 0.02$, 与Model组比较。

A: HE staining images; B: TUNEL staining images; C: LFB staining images; D: pathological scores of EAE model mice; E: transmission electron microscopy images. *** $P < 0.001$ compared with Control3 group; ## $P < 0.01$ compared with Model group.

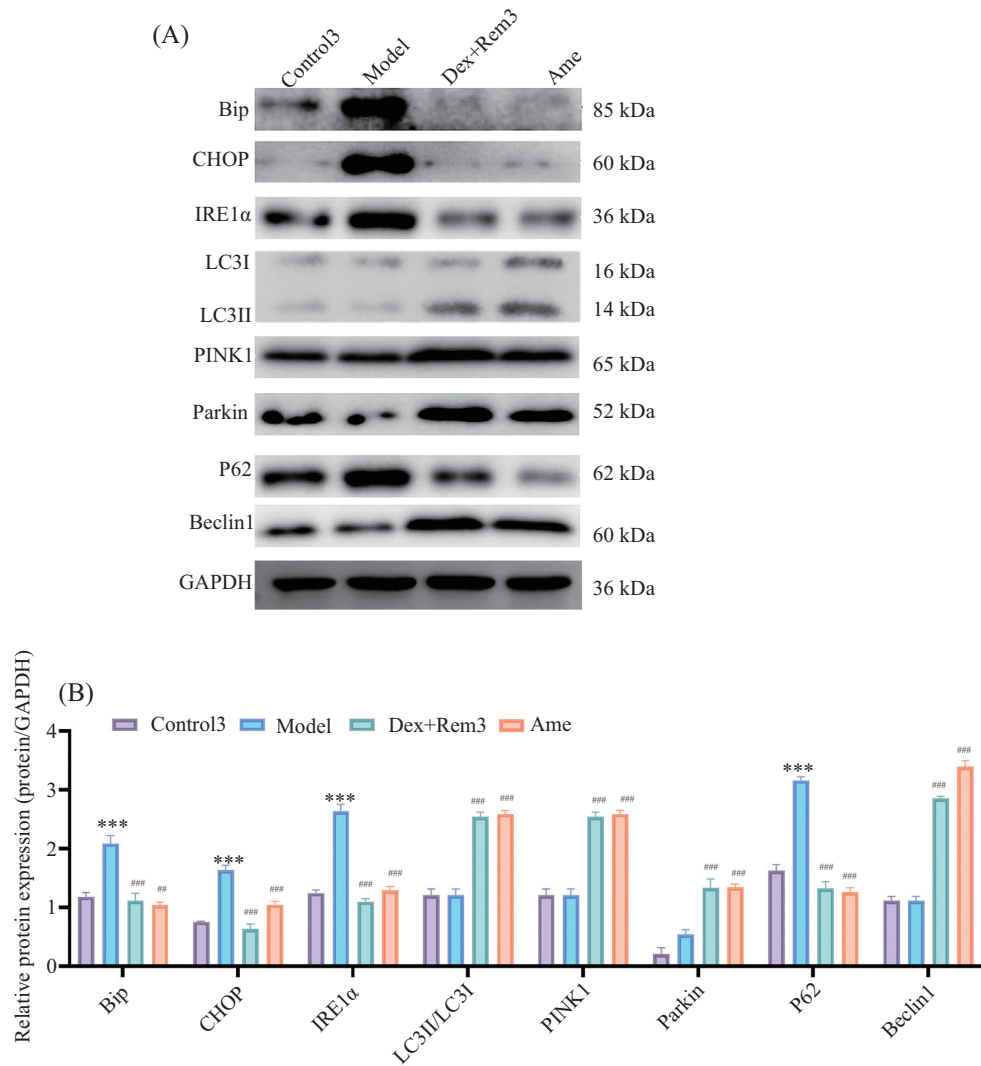
图5 右美托咪定联合瑞马唑仑延缓实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠疾病进展
Fig.5 Dexmedetomidine combined with remimazolam alleviates disease progression in experimental autoimmune encephalomyelitis model mice

能障碍^[17]。近年来研究表明,内质网应激驱动的未折叠蛋白反应过度激活是多发性硬化症中少突胶质细胞死亡和炎症级联放大的关键机制^[18]。本研究聚焦于IRE1 α 分支,是因为大量前期证据表明,在多发性硬化症/EAE的神经炎症环境中,IRE1 α 信号轴是连接内质网应激与炎症小体激活以及促炎细胞因子(如IL-1 β 、IL-6、TNF- α)产生的关键通路^[4]。本研究发现LPS刺激显著上调BV2细胞内质网应激标志蛋白Bip、CHOP和IRE1 α 表达,这与BRAVO团队^[19]观点一致,即内质网应激通过激活蛋白激酶R样内质网激酶-真核翻译起始因子2 α -激活转录因子4/CHOP轴触发少突胶质细胞凋亡,并促进小胶质细胞向促炎表型极化。

值得注意的是,本研究中Dex单药(9 μ mol/L)已显著抑制内质网应激蛋白表达(Bip、CHOP、IRE1 α)及促炎因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)释放,这与张小宝^[20]观察到Dex通过抑制应激活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶-丝裂原活化蛋白激酶通路减轻

胶质细胞炎症的结果形成互补。而联合Rem后,细胞保护作用进一步增强,暗示瑞马唑仑可能通过未知通路协同调控内质网应激。这一现象与近期报道的瑞马唑仑抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴降低皮质醇的机制存在潜在关联^[21],但本研究发现其协同作用更可能源于对自噬-内质网应激交互网络的深度调节。

本研究首次揭示Dex+Rem通过激活自噬流抑制内质网应激,而SANADGOL团队^[23]提出线粒体自噬缺陷是多发性硬化症中少突胶质细胞死亡的核心因素^[22]。本团队发现联合用药显著提升自噬关键蛋白Beclin1和线粒体自噬调控蛋白PINK1/Parkin,证实其通过修复自噬溶酶体途径清除错误折叠蛋白,阻断内质网应激向凋亡转化。该机制拓展了Dex神经保护的传统认知——既往研究多聚焦其抑制凋亡或焦亡的作用。本研究中Dex+Rem显著降低促炎因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的表达水平,这与杨举等^[24]报道的右美托咪定通过热休克蛋白60/Toll样受体4-



A: 内质网应激和自噬蛋白条带图; B: 内质网应激和自噬蛋白统计图; *** $P<0.001$, 与Control3组比较; ### $P<0.001$, 与Model组比较。

A: Western blot bands of endoplasmic reticulum stress-related and autophagy-related proteins; B: statistical graphs of endoplasmic reticulum stress-related and autophagy-related proteins. *** $P<0.001$ compared with Control3 group; ### $P<0.001$ compared with Model group.

图6 右美托咪定联合瑞马唑仑通过抑制内质网应激促进自噬减轻实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠疾病进展
Fig.6 Dexmedetomidine combined with remimazolam alleviates disease progression in experimental autoimmune encephalomyelitis model mice by suppressing endoplasmic reticulum stress and promoting autophagy

核因子 κ B通路抑制小胶质细胞活化的结果一致。但联合用药还同步提升细胞愈合与侵袭能力,提示其可能促进小胶质细胞向抗炎M2表型转化。这一假设得到支持,即Dex单药即可增加小胶质细胞M2型标记物表达水平,且这依赖蛋白激酶K信号通路^[25]。此外,在EAE模型中观察到联合用药减轻脊髓脱髓鞘和减少神经元凋亡,这与心肌细胞缺氧模型中发现右美托咪定通过抑制内质网应激维持线粒体功能的保护作用高度相似^[26]。这表明Dex+Rem的内质网应激调控具有跨器官普适性,为多发性硬化症等神经退行性疾病的治疗提供了新思路。

但本文同时还存在以下局限性,虽明确自噬-内质网应激轴参与联合用药的保护作用,但Dex与Rem的具体作用靶点尚未解析,需通过基因敲除或抑制剂实验验证。EAE模型主要模拟多发性硬化症急性炎症期,但无法体现慢性神经退行进程。因此,需在进展多发性硬化症模型中评估长期用药风险。本研究表明Dex+Rem通过协同抑制内质网应激并激活自噬,在多发性硬化症模型中实现多层次神经保护。这一机制不仅深化了对镇静药物免疫调节功能的理解,也为开发靶向内质网应激-自噬轴的多发性硬化症联合疗法提供了实验依据。未来研究可结合单细

胞测序技术解析少突胶质细胞特异性内质网应激信号图谱, 并探索非编码RNA与药物作用的互作网络, 以推动精准化治疗策略的发展

参考文献 (References)

- [1] MARCUS R. What is multiple sclerosis [J]? JAMA, 2022, 328(20): 2078.
- [2] COHAN S, KUMAR J, ARNDORFER S, et al. Comparative efficacy and safety of ozanimod and dimethyl fumarate for relapsing-remitting multiple sclerosis using matching-adjusted indirect comparison [J]. CNS Drugs, 2021, 35(7): 795-804.
- [3] MAGHBOOLI Z, SAYAHPOUR FA, VARZANDI T, et al. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation in multiple sclerosis [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 22916.
- [4] WANG C, CHANG Y, ZHU J, et al. Dual role of inositol-requiring enzyme 1 α -X-box binding protein 1 signaling in neurodegenerative diseases [J]. Neuroscience, 2022, 505: 157-70.
- [5] HASSAB LY, ABBAS SS, MOHAMMED RA, et al. Dimethyl fumarate abrogates striatal endoplasmic reticulum stress in experimentally induced late-stage Huntington's disease: focus on the IRE1 α /JNK and PERK/CHOP trajectories [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1133863.
- [6] WANG X, SUN Y, YU H, et al. The regulation of microglia by aging and autophagy in multiple sclerosis [J]. Pharmacol Res, 2025, 216: 107786.
- [7] RUSMINI P, CORTESE K, CRIPPA V, et al. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration [J]. Autophagy, 2019, 15(4): 631-51.
- [8] BAI YX, ZHANG JH, ZHAO BC, et al. Dexmedetomidine attenuates one-lung ventilation associated lung injury by suppressing inflammatory responses: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2021, 48(9): 1203-14.
- [9] ZHOU L, SHI H, XIAO M, et al. Remimazolam attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive dysfunction [J]. Behav Brain Res, 2025, 476: 115268.
- [10] LI H, ZHANG X, CHEN M, et al. Dexmedetomidine inhibits inflammation in microglia cells under stimulation of LPS and ATP by c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascades [J]. EXCLI J, 2018, 17: 302-11.
- [11] DUAN M, YU N, LIU J, et al. Remimazolam suppresses oxidative stress and apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury by regulating AKT/GSK-3 β /NRF2 pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2025, 19: 111-28.
- [12] AHMED B, KHAN MN, NISAR MA, et al. Tunicamycin enhances the suppressive effects of cisplatin on lung cancer growth through PTX3 glycosylation via AKT/NF- κ B signaling pathway [J]. Int J Oncol, 2019, 54(2): 431-42.
- [13] LIU Z, LIN X, TU Y, et al. MALAT1 promotes microglia activation and neuronal apoptosis through the miR-124-3p/SGK1 axis mediating experimental autoimmune encephalomyelitis disease progression in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2025, 152: 114417.
- [14] SHI J, YU T, SONG K, et al. Dexmedetomidine ameliorates endotoxin-induced acute lung injury *in vivo* and *in vitro* by preserving mitochondrial dynamic equilibrium through the HIF-1 α /HO-1 signaling pathway [J]. Redox Biol, 2021, 41: 101954.
- [15] LIU X, SHUI G, WANG Y, et al. Remimazolam alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury and inflammation via inhibition of the NLRP3/IL-1 β pathway in mice [J]. Int J Mol Med, 2025, 55(4): 10466-82.
- [16] CHEN Y, YAN Y, LIU H, et al. Dihydroartemisinin ameliorates psoriatic skin inflammation and its relapse by diminishing CD8⁺ T-cell memory in wild-type and humanized mice [J]. Theranostics, 2020, 10(23): 10466-82.
- [17] MCGINLEY MP, GOLDSCHMIDT CH, RAE-GRANT AD. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis: a review [J]. JAMA, 2021, 325(8): 765-79.
- [18] KARAMALI N, MOGHADAM RK, FARAHANI MB, et al. Pathophysiology of endoplasmic reticulum stress and the potential role of dexmedetomidine as a modulator [J]. Biofactors, 2025, 51(4): e70022.
- [19] HAAKONSEN DL, HEIDER M, INGERSOLL AJ, et al. Stress response silencing by an E3 ligase mutated in neurodegeneration [J]. Nature, 2024, 626(8000): 874-80.
- [20] 张小宝. 右美托咪定抑制胶质细胞炎症反应的机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2015.
- [21] LIU Y, LIU C, ZHOU Q, et al. Comparison of remimazolam besylate and dexmedetomidine on stress response and immune balance in patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Ir J Med Sci, 2025.
- [22] SANADGOL N, SAMADI M, VOELZ C, et al. Genomic ncRNAs regulating mitochondrial function in neurodegeneration: a neglected clue in the complex etiopathogenesis of multiple sclerosis [J]. Cell Biosci, 2025, 15(1): 93.
- [23] 赵谦, 杨剑. 右美托咪定调控细胞凋亡和焦亡在中枢神经保护作用中的机制研究进展[J]. 中国医药(ZHAO Q, YANG J. Research progress on the mechanism of dexmedetomidine regulating apoptosis and pyroptosis in central nervous protection [J]. China Medicine), 2022, 17(5): 789-92.
- [24] 杨举, 夏振娜, 罗雪, 等. 右美托咪定通过HSP60-TLR4-NF- κ B通路抑制热应激诱导的小胶质细胞活化[J]. 中国热带医学(YANG J, XIA Z N, LUO X, et al. Dexmedetomidine inhibits heat stress-induced microglial activation via the HSP60-TLR4-NF- κ B pathway [J]. Chinese Journal of Tropical Medicine, 2018, 18(8): 761-5.
- [25] 孙志恒. 盐酸右美托咪定在炎症抑制和BV-2小胶质细胞极化中的作用[D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [26] 王展, 石伯生, 成燕. 右美托咪定通过线粒体和内质网氧化应激途径减轻缺氧诱导的心肌细胞损伤的研究[J]. 临床和实验医学杂志(WANG Z, SHI B S, CHENG Y. Dexmedetomidine alleviates hypoxia-induced cardiomyocyte injury through mitochondrial and endoplasmic reticulum oxidative stress pathways [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine), 2022, 21(7): 695-8.