

## · 论著 ·

## 缺血后处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用及其最佳时间窗的探讨

刘佳丽<sup>1</sup>, 王晔<sup>2</sup>, 张迎<sup>2</sup>

1. 大连医科大学, 辽宁省大连市 116044

2. 沈阳军区总医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110015

**摘要:** **目的** 探讨缺血后处理(IP)对大鼠局灶性脑缺血再灌注(I/R)神经保护作用的最佳时间窗。**方法** 80只雄性SD大鼠,随机分为5组(假手术组、对照组、IP 15s组、IP 30s组和IP 1min组)。假手术组和对照组行单纯I/R;IP 15s组、IP 30s组和IP 1min组,反复3次缺血再灌注。除假手术组外的大鼠均采用线栓法闭塞大鼠大脑中动脉(MACO)建立脑缺血SD大鼠模型。所有大鼠行神经功能障碍评分(NDS),并应用组织原位标记凋亡细胞检测、免疫组织化学等技术观察IP后海马CA1区细胞凋亡及肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )表达的变化。**结果** 再灌注24h后,IP各组NDS明显低于对照组( $P < 0.05$ ),其中IP 15s组、IP 30s组NDS低于IP 1min组( $P < 0.05$ )。对照组海马CA1区TNF- $\alpha$ 、凋亡细胞表达量明显增加,IP 15s组、IP 30s组海马CA1区TNF- $\alpha$ 、凋亡细胞的表达量较IP 1min组明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** IP可改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能、减少海马CA1区炎性因子TNF- $\alpha$ 及细胞凋亡的表达。大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用的最佳时间窗为15s、30s。

**关键词:** 缺血后处理;脑保护;时间窗;缺血再灌注损伤;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;细胞凋亡

## Neuroprotection and optimal time window of ischemic postconditioning against cerebral ischemia reperfusion injury in rats

LIU Jia-Li, WANG Ye, ZHANG Ying. Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the optimal time window of ischemic postconditioning (IP) against focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** Eighty male SD rats were randomly assigned into five groups: a sham-operated, a control and three IP (different time intervals: 15 s, 30 s and 1 min). Focal cerebral ischemia model was established via middle cerebral artery occlusion (MCAO) with the intraluminal filament technique. The neurological deficit scores (NDS) were evaluated 24 hours after reperfusion. The apoptosis of brain cells and the levels of TNF- $\alpha$  in the hippocampal CA1 area were evaluated by TUNEL and immune stained method respectively. **Results** The behavioral tests showed IP attenuated neurological deficits after I/R. The NDS in the IP groups decreased significantly compared with the control group ( $P < 0.05$ ), and the NDS in the IP 15s and IP 30s groups were lower than in the IP 1min group ( $P < 0.05$ ). The number of surviving neurons increased significantly in the IP groups as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). IP significantly decreased the level of TNF- $\alpha$  in the hippocampal CA1 area compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The level of TNF- $\alpha$  was significantly higher in the IP1min group than in the IP 15s and IP 30s groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** IP could improve functional outcomes, decrease the expression of TNF- $\alpha$  and reduce the nerve cell apoptosis. The optimal time window of IP against cerebral I/R injury may be 15 s and 30 s.

**Key words:** Ischemic postconditioning; time window; brain protection; Ischemia-reperfusion injury; TNF- $\alpha$ ; apoptosis

在发达国家脑卒中是继心肌梗死和癌症后引起人类死亡的第三大原因,因此寻找有效脑保护方

基金项目:沈阳军区总医院基金资助项目(08Y-E05)

收稿日期:2011-03-21;修回日期:2011-05-09

作者简介:刘佳丽(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向:脑血管疾病基础与临床研究。

通讯作者:王晔(1967-),男,博士后,教授,主任医师,主要研究方向:脑血管病、神经变性病、神经肌肉病, E-mail: wangye@sina.com。

法,最大可能地激发缺血后脑保护机制,使脑损害降至最低程度,是临床上亟待解决的问题。1990 年,Kitagawa 等<sup>[1]</sup>在沙土鼠脑缺血模型上首次描述了脑缺血预处理(Ischemic preconditioning, IPC)现象,随后这一理论又在其他器官(脑、肝、肠、肾、肺)及其他多种动物模型中得到证实<sup>[2,3]</sup>。然而在临床应用中,缺血事件是不可预知的。为了解决这一难题,2003 年,Zhao 等<sup>[4]</sup>发现大鼠心肌缺血后再灌注前,进行反复、短暂的心肌缺血再灌注能保护心肌并以对抗随后的再灌注损伤,提出了缺血后处理(IP)的概念。随后研究证实,在脑缺血再灌注前,行短暂的重复缺血可减轻脑缺血再灌注损伤<sup>[5]</sup>,它的神经保护作用在多种动物模型中得到了证实<sup>[6-9]</sup>。研究表明,脑缺血再灌注可导致缺血及周边区域神经细胞的坏死和凋亡。其中 TNF- $\alpha$  等参与了细胞凋亡的调节。TNF- $\alpha$  是最早产生并发挥作用的促炎细胞因子,在缺血再灌注后的脑组织损伤中起重要作用。本研究通过测定各 IP 组大鼠的行为学的改变,海马 CA1 区细胞凋亡、TNF- $\alpha$  含量变化探讨在具体情况下 IP 的最佳时间窗,为临床治疗缺血性脑血管病提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠 80 只,体重 250 ~ 300 g,凋亡检测试剂盒、免疫组化试剂盒均为武汉博士得公司产品,OLYMPUS BX41 显微图像分析系统。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制作 SD 大鼠 80 只,随机分为 5 组(假手术组、对照组、IP 15s 组、IP 30s 组和 IP 1min 组),每组 16 只。所有实验动物术前 24h 禁食,自由饮水。参照 Longa 线栓法<sup>[10]</sup>制备大鼠右侧 MCAO 模型。水合氯醛 0.35g/kg 体重,腹腔麻醉,剪去颈正中位皮毛,消毒,铺巾,取颈正中皮肤切口,钝性分离肌肉及皮下组织,暴露右侧颈总动脉(CCA),分离迷走神经,切忌钳夹,钝性分离颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),结扎分支,用手术剪剪开 CCA 一小口将一预先用酒精灯烧成圆头的 320 尼龙线置入 ICA14 ~ 15 mm,直到有轻微阻力感为止。假手术组仅暴露颈总动脉及分叉处。对照组阻闭 60 min 后抽出尼龙线。IP 组于 MCAO 60 min 后,将尼龙线拔出 5 ~ 8 mm,依据分组,再灌注时间 15 s、30 s 和 1 min,再将尼龙线放入原位置,缺血时间分别为 15 s、30 s 和 1 min,反

复 3 次,恢复再灌注。24 h 后行神经功能障碍评分,然后处死大鼠。

### 1.2.2 观测指标

1.2.2.1 神经行为学评估 麻醉苏醒后,将动物放回鼠笼,自由饮食。脑缺血再灌注后 24 h,按文献<sup>[11]</sup>的方法双盲法评估记录 NDS,0 级:无功能障碍;1 级:不能伸展左侧前肢;2 级:向左侧旋转;3 级:向左侧倾倒;4 级:无自主活动伴有意识障碍;5 级:死亡。

1.2.2.2 TUNEL 染色细胞凋亡检测 切片常规脱蜡,按照试剂说明书操作,DAB 显色、乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。于 50 倍低倍视野下确定缺血侧海马区及海马 CA1 区位置后,在 400 倍视野下选取缺血侧海马 CA1 区 5 个不重复视野进行仔细观察,细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡阳性细胞,计算凋亡阳性细胞数同时进行拍照。神经元凋亡指数(apoptosis Index, AI) = 凋亡细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ ,结果取均数。

1.2.2.3 免疫组织化学检测 取出鼠脑后,4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、石蜡切片,以二甲苯脱蜡和酒精脱水。免疫组化简要步骤如下:切片以 1%  $H_2O_2$  灭活内源性过氧化物酶,抗原热修复,正常山羊血清封闭,PBS 洗涤,分别滴加 1:200 稀释的兔抗鼠 TNF- $\alpha$  多克隆抗体,4℃ 过夜,次日 PBS 洗涤,再滴加二抗生物素化抗兔 IgG, PBS 洗涤,DAB 染色,苏木素复染。脱水透明,中性树胶封片。在 50 倍视野下确定缺血侧海马区及海马 CA1 区位置后,400 倍视野下选取海马 CA1 区 5 个不重复视野进行仔细观察,TNF- $\alpha$  阳性细胞表达特点为细胞核及胞浆呈棕黄色,分别拍照。采用免疫组化图像分析系统作阳性细胞计数,求得阳性细胞平均数。

1.2.3 统计学处理 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 神经功能障碍评分比较

术后所有动物均存活。假手术组大鼠未见神经功能损害,缺血各组动物均表现出一定神经功能障碍(图 1)。I/R 24 h 后与对照组相比,IP 15s 组、IP 30s 组和 IP 1min 组 NDS 显著降低( $P < 0.05$ ),其中 IP 15s 组和 IP 30s 组 NDS 低于 IP1min 组( $P < 0.05$ )(表 1)。

表1 各组大鼠再灌注24 h后NDS (n=16,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	神经功能障碍评分或NDS					$\bar{x} \pm s$
	0	1	2	3	4	
假手术组	16	0	0	0	0	0
对照组	0	4	7	4	1	$2.20 \pm 0.89^*$
IP 15s 组	0	8	7	1	0	$1.56 \pm 0.63^\Delta$
IP 30s 组	0	9	7	0	0	$1.44 \pm 0.51^\Delta$
IP 1min 组	0	7	8	1	0	$1.63 \pm 0.62^{\Delta\#}$

注：\* 为与假手术组相比较,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$  为与对照组比较,  $P < 0.05$ ; # 为与 IP 15s 组、IP 30s 组比较,  $P < 0.05$ 。

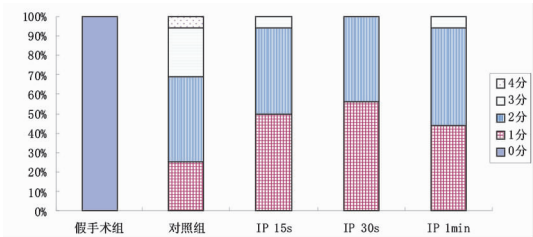


图1 各组大鼠在灌注24 h后神经功能缺损评分比较

2.2 凋亡细胞的表达

凋亡细胞胞核染色呈棕黄色,主要分布于缺血侧大鼠脑组织,非缺血侧少见凋亡细胞出现。假手术组海马 CA1 区偶可见极少数凋亡阳性细胞(图

2)。缺血各组大鼠海马 CA1 区均可见凋亡细胞,核固缩黄染,胞体缩小形状不规则。对照组可见较多凋亡细胞,细胞核中有大量棕黄色颗粒,数个深染散在分布的凋亡小体围绕在细胞核周围。如表2所示,假手术组 CA1 区细胞 AI ( $4.51 \pm 0.41$ ) 最小,与其它各组比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。IP 各组 AI 分别为 ( $24.16 \pm 2.93$ )、( $23.30 \pm 2.84$ ) 和 ( $28.67 \pm 3.79$ ),与对照组 ( $40.63 \pm 2.40$ ) 比较 AI 明显降低 ( $P < 0.05$ )。经统计分析,IP 15s 组、IP 30s 组海马 CA1 区细胞 AI 较 IP 1min 组低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

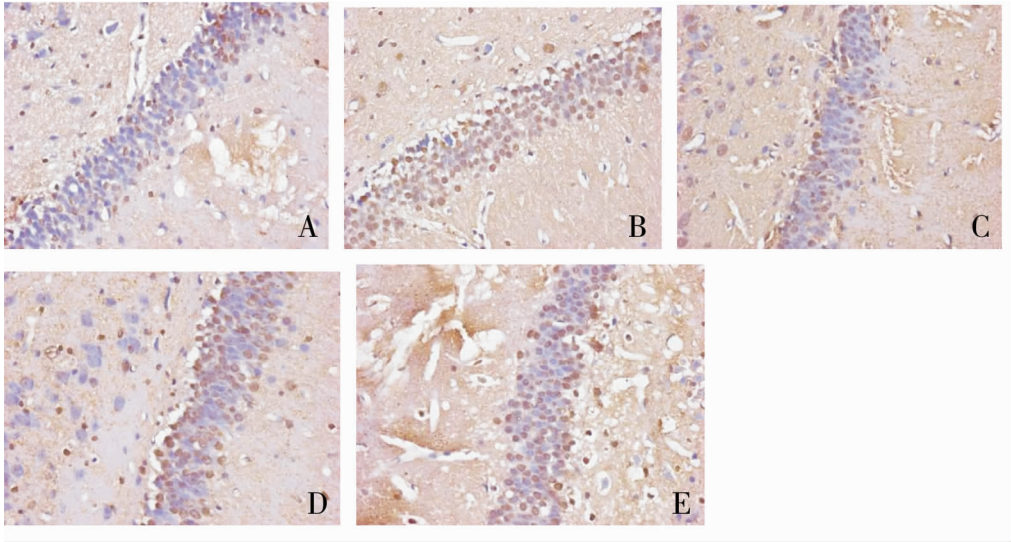


图2 大鼠海马 CA1 区凋亡细胞的表达 (×400)。A:假手术组;B:对照组;C:IP 15 组;D:IP 30s 组;E:IP 1min 组。

2.3 免疫组织化学结果

如图3所示,TNF- $\alpha$  表达阳性的细胞核和(或)胞浆呈棕黄色,未表达细胞核呈蓝色。假手术组海马 CA1 区可见极少数 TNF- $\alpha$  阳性细胞散在分布,对照组海马 CA1 区可见大量 TNF- $\alpha$  胞浆棕染的阳性细胞,其 TNF- $\alpha$  阳性细胞数 ( $39.63 \pm 2.87$ ) 与

假手术组 ( $8.69 \pm 1.03$ ) 相比差异明显 ( $P < 0.01$ )。IP 15s 组、IP 30s 组和 IP 1min 组与对照组比较,可见海马 CA1 区 TNF- $\alpha$  阳性细胞数明显减少,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。IP 1min 组 TNF- $\alpha$  阳性细胞数与 IP 15s 组和 IP 30s 组比较明显升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表2)。

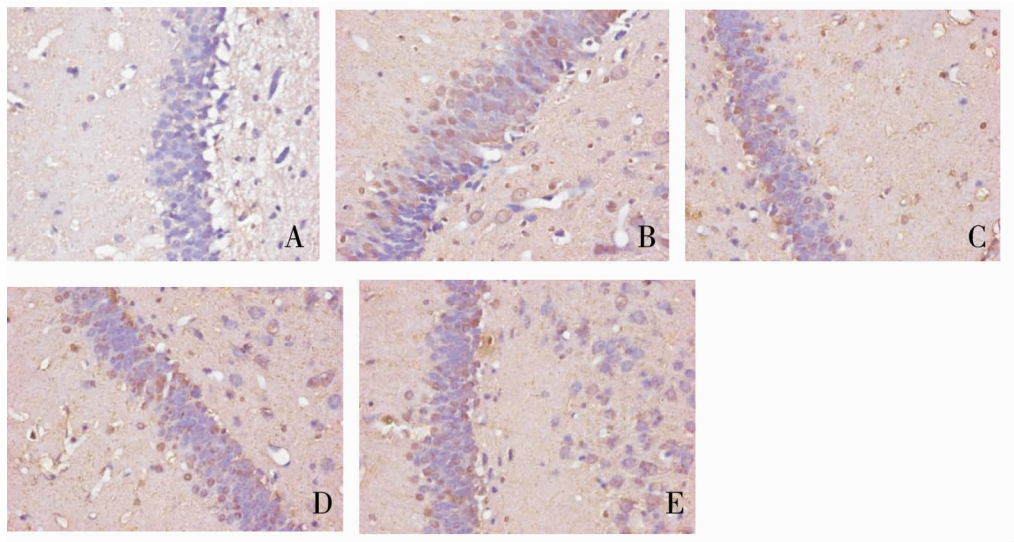


图 3 大鼠海马 CA1 区 TNF-α 的表达 (×400)。A:假手术组;B:对照组;C:IP 15 组;D:IP 30s 组;E:IP 1min 组。

表 2 大鼠海马区细胞凋亡指数、TNF-α 阳性细胞数的比较 (n = 16,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-α	AI(%)
假手术组	8.69 ± 1.03	4.51 ± 0.41
对照组	39.63 ± 2.87 <sup>#</sup>	40.63 ± 2.40 <sup>#</sup>
IP 15 s	23.16 ± 2.36 <sup>*</sup>	24.16 ± 2.93 <sup>*</sup>
IP 30 s	23.29 ± 2.38 <sup>*</sup>	23.30 ± 2.84 <sup>*</sup>
IP 1min	28.06 ± 2.97 <sup>*△</sup>	28.68 ± 3.79 <sup>*△</sup>

注: \* 为与对照组相比较,  $P < 0.05$ ; △ 为与 IP 15s 组、IP 30s 组比较,  $P < 0.05$ ; # 为与假手术组比较,  $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验采用大鼠局灶性脑缺血模型研究了 IP 对脑的保护作用。证实短暂的 IP 可改善由于大鼠大脑中动脉梗塞引起的神经功能改变,减少细胞凋亡,减轻脑缺血后神经损伤,抑制 TNF-α 在海马 CA1 区的表达。IP 的最佳处理时间窗为 15 s、30 s。

凋亡是神经元继发性或迟发性死亡的主要方式,多发生在缺血后期的缺血半暗带。缺血再灌注性脑损伤可致神经细胞凋亡<sup>[12, 13]</sup>,既往报道 IP 可通过阻断凋亡降低缺血性损伤<sup>[14]</sup>。海马 CA1 区是中枢神经系统中易损部位。本实验观察到假手术组极少出现凋亡细胞;缺血各组海马 CA1 区均出现阳性细胞。IP 各组较对照组阳性细胞表达减弱,IP 15s 组和 IP 30s 组凋亡细胞下降最为明显 ( $P < 0.05$ ),提示 IP 可减少细胞凋亡,从而发挥神经保护作用,其最佳保护时间窗为 15 s、30 s。

再灌注后炎症反应同样加剧脑损伤<sup>[15]</sup>。TNF-

α 是重要的炎性和促炎性细胞因子,与炎症反应、血栓形成和血管反应等的发生密切相关。TNF-α 本身也可增加血脑屏障通透性并破坏其完整性,加重 I/R 后的继发性损伤和脑水肿。TNF-α 表达越弱保护作用越强。本研究显示,脑梗死各组海马 CA1 区阳性细胞数较假手术组明显上升,提示存在严重炎症反应。IP 组 TNF-α 表达减弱,表明其可以抑制缺血后海马 CA1 区 TNF-α 的表达,减轻炎症反应,减少梗死灶内的细胞凋亡。IP 15s 组和 IP 30s 组 TNF-α 阳性细胞数较 IP 1min 组表达减弱,IP 15s、IP 30s 两组间比较差异无统计学意义,表明该两组对 I/R 后的炎症抑制及脑保护作用最强。以上结果提示 IP 通过降低炎症因子的表达、抑制炎症反应对缺血再灌注起保护作用,抑制缺血后 TNF-α 的表达可能是 IP 的保护作用之一,其最佳保护时间窗为 15 s、30 s。

IP 减轻脑损伤机制尚不明了。心脏相关研究显示,只有在缺血再灌注早期,IP 可以减轻炎症反应和改善氧自由基代谢,激活再灌注损伤,清除激酶信号<sup>[16]</sup>,抑制线粒体敏感性转化孔的开放,从而减少了细胞的凋亡和坏死,起到器官保护作用<sup>[17, 18]</sup>。本实验证实了脑 IP 保护效应也在脑缺血再灌注的早期发生,并且通过对各组大鼠行为学评分、海马 CA1 区 AI、TNF-α 的测定,明确了不同时间点所产生保护效应的强弱,其中 15 s、30 s 时的脑保护、抑制炎症反应作用最强。表明 IP 能够改善缺血再灌注的病理学损害,改善脑功能,IP 的最

佳保护时间窗为 15 s、30 s。IP 的可控性使其在临床治疗方面具有较大潜力,若能阐明其作用机制,将其药物开放及实际应用于临床治疗提供更可靠的理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *J Brain Res*, 1990, 528: 21-24.
- [2] Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al. Ischemic preconditioning, myocardial stunning, and hibernation: basic aspects. *Am Heart J*, 1999, 138: S61-68.
- [3] Tomai F, Crea F, Chiariello L, et al. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators and clinical relevance. *Circulation*, 1999, 100: 559-563.
- [4] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *J Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): 5792-588.
- [5] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26: 1114-1121.
- [6] Xing BZ, Chen H, Zhang M, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke*, 2008, 39: 2362-2369.
- [7] Wang JY, Shen J, Gao Q. Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke*, 2008, 39: 983-990.
- [8] Ren CC, Yan ZM, Wei DT, et al. Limb remote ischemic postconditioning protects against focal ischemia in rats. *Brain Res*, 2009, 1288: 88-94.
- [9] Taskapilioglu MO, Alkan T, Goren B, et al. Neuronal protective effects of focal ischemic pre- and/or postconditioning on the model of transient focal cerebral ischemia in rats. *J Clin Neurosci*, 2009, 16: 693-697.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *J Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] Zhang ZG, Zhang QZ, Cheng YN, et al. Antagonistic effects of ultra low molecular weight heparin against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pharmacol Res*, 2007, 56(4): 350-355.
- [12] Li Y, Chopp M, Jiang N, et al. Temporal profile of inset DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow*, 1995, 15(3): 389-397.
- [13] Kogure T, Kogure K. Molecular and histochemical events within the brain subjected to cerebral ischemia. *J Clin Neurosci*, 1997, 4(4): 179-183.
- [14] 付振强,张博爱,贾延劫.缺血后处理脑保护研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(2): 128-131.
- [15] Bowen KK, Naylor M, Vemuganti R. Prevention of inflammation is a mechanism of preconditioning induced neuroprotection against focal cerebral ischemia. *Neurochem Int*, 2006, 49: 127-135.
- [16] Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: A form of "modified reperfusion" protects myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *J Circ Res*, 2004, 95(3): 230-232.
- [17] Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, et al. Postconditioning in habits mitochondrial permeability transition. *J Circulation*, 2005, 111(2): 194-197.
- [18] Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *J Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 264 - 273.