

脑缺血预处理诱导大鼠脑缺血耐受的研究

程道宾¹ 王 进¹ 罗杰峰¹ 曾 丽¹ 秦 超¹

摘要 目的: 探讨局灶性脑缺血预处理在大鼠脑缺血耐受中的作用及机制。**方法:** 线栓法制作大鼠右大脑中动脉阻塞的局灶性脑缺血模型。在缺血预处理组脑缺血预处理 15min; 3d 后, 再次阻塞右大脑中动脉 8h。评估神经功能缺失、脑梗死体积和右脑组织形态学, 免疫组化法检测右脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达。**结果:** 缺血预处理组大鼠神经功能缺失评分明显改善 ($P < 0.01$), 脑梗死体积明显减小 ($P < 0.01$), 缺血损伤改变明显减轻, TNF- α 和 iNOS 的表达也明显减少 ($P < 0.05$)。**结论:** 局灶性脑缺血预处理可诱导大鼠脑缺血耐受, 其机制可能是抑制缺血脑组织表达 TNF- α 及 iNOS 而减轻炎症免疫损伤。

关键词 脑梗死; 缺血预处理; 缺血耐受; 肿瘤坏死因子- α ; 诱导型一氧化氮合酶; 大鼠

中图分类号: R493, R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-07-0599-03

A study on ischemic preconditioning as induction of cerebral ischemic tolerance in rat/CHENG Daobin, WANG Jin, Luo Jiefeng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(7):599—601

Abstract Objective: To investigate the effects and the mechanisms of focal cerebral ischemic precondition on cerebral ischemic tolerance in rats. **Method:** The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of rats were made by using a thread to occlude the right middle cerebral artery. In ischemic preconditioning group rats were subjected to 15 minutes cerebral ischemia; 3d later MCAO for 8h again. The neurologic impairment, the volume of cerebral infarction and the right brain tissue morphology of rats were evaluated. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in right brains were assayed by immunohistochemistry. **Result:** In ischemic preconditioning group rats the neurologic impairment scores were improved significantly ($P < 0.01$), and the volumes of cerebral infarctions were decreased significantly ($P < 0.01$), and ischemic damage was mitigated significantly, and the expressions of TNF- α and iNOS were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cerebral ischemic tolerance of rat could be induced by focal cerebral ischemic precondition, and its mechanism were probably from inhibiting the expressions of TNF- α and iNOS in cerebral ischemic tissue and thus alleviating inflammatory immunologic injury.

Author's address Dept. of Neurology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, 530027

Key words cerebral infarction; ischemic preconditioning; ischemic tolerance; TNF- α ; iNOS; rat

1990 年 Kitagawa 等^[1]发现短暂的并不导致细胞死亡的脑缺血, 可降低 1—7d 后再次持续的导致脑细胞死亡的缺血所产生的损伤作用, 这种现象被称为脑缺血耐受现象, 而提前给予的短暂性缺血被称为缺血预处理。目前, 短暂性脑缺血诱导脑缺血耐受的确切机制还不清楚。本研究旨在探讨局灶性脑缺血预处理在大鼠脑缺血耐受中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 220—250g, 清洁级, 由广西医科大学实验动物中心提供。动物被分成缺血预处理组 (n=11)、非缺血预处理组 (n=11) 和正常组 (n=2, 作正常脑组织切片用)。

1.2 制作大鼠脑缺血预处理及局灶性脑缺血模型

实验前 24h, 大鼠禁食但自由饮水。腹腔内注射 10% 的水合氯醛 (1ml/kg) 麻醉大鼠。按 Longa 等^[2]线栓法制作大鼠局灶性脑缺血模型, 即: 颈部脱毛后仰卧位固定大鼠于手术台上, 常规消毒后在无菌条件下颈正中切开, 分离右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA)、颈内动脉 (internal carotid artery, ICA), 电热烧灼器烧断 ECA 的分支, 结扎并游离 ECA 主干一段, 沿 ICA 向下分离翼腭动脉, 穿线沿起点结扎; 线栓采用直径 0.23mm 尼龙丝线, 插入端用火烧圆 (直径 0.25—0.28mm), 线栓从 ECA 与 CCA 分叉处沿 ICA 进线约 18—20mm, 遇到阻力则止, 阻塞右侧大

1 广西医科大学第一附属医院神经内科, 南宁, 530027

作者简介: 程道宾, 男, 博士, 讲师

收稿日期: 2007-01-04

脑中动脉(middle cerebral artery, MCA), 结扎 ECA 近心端。15min 后, 缺血预处理组从 ECA 轻轻抽出尼龙丝线约 18mm, 形成再灌注, 将线尾埋在皮下; 缝合切口, 完成脑缺血预处理。3d 后再次麻醉大鼠, 剪开皮肤缝线, 剪开 ECA 近心端结扎线, 将埋在皮下的尼龙丝线再次推入 ICA 造成 MCA 阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO), 重新结扎 ECA 近心端, 将线尾埋在皮下, 缝合切口。非缺血预处理组除线栓进入 ICA 约 15mm 外, 其余步骤相同。术前、术中及术后每天消毒伤口 1 次。右大脑中动脉阻塞 8h 后作以下研究。

1.3 神经功能缺失评分

缺血预处理后至再次 MCA 阻塞前和再次 MCA 阻塞 8h 后, 在大鼠清醒下分别对大鼠的神经功能缺失进行评分, 并按 Huang 等^[3]描述进行记分: 0 分, 未见神经功能缺失(正常); 1 分, 通过尾巴提起整个大鼠, 大鼠左前脚不能伸展(轻度); 2 分, 向对侧环绕步态(中度); 3 分, 休息时向对侧倾倒或无自发的运动活动(重度)。

1.4 TTC 染色和图像采集评估梗死体积

大鼠右侧 MCA 阻塞 8h 后, 用 TTC 染色法评估梗死体积: 麻醉并断头处死大鼠; 快速取脑并置入冰冻生理盐水 5min; 经脑切片机制成 2mm 厚的冠状切片; 切片在 37℃ 含 2% TTC 生理盐水中孵育 15min; 染色的脑切片置入 10% 福尔马林并在 4℃ 下冷藏, 以作进一步研究; 应用梯形法获得每只大鼠的梗死体积。

1.5 脑组织切片的形态学评估

用 4% 缓冲甲醛溶液固定脑组织切片; 石蜡包埋脑组织并切成 4μm 厚的切片; 然后, 切片用 HE 染色, 并评估脑组织形态学改变。

1.6 免疫组化法检测 TNF-α 和 iNOS

对石蜡包埋的甲醛固定的脑组织切片进行 TNF-α 和 iNOS 染色, 即: 脑组织切片在乙醇中脱蜡而再水化, 然后浸入 PBS 溶液(pH7.4); 切片微波修复抗原 2min 后, 用 PBS 洗涤 3×2min; 切片在 3% 过氧化氢蒸馏水中浸泡 25min, 以消除内源性过氧化物酶活性; 切片浸入 1% 小牛血清白蛋白 PBS 溶液 1h 后用山羊血清稀释 30min 以减少非特异性染色; 切片分别用 1:100 小鼠抗 TNF-α 单克隆抗体和 1:100 兔抗 iNOS 多克隆抗体在 4℃ 下孵育过夜, 再用 0.1% Tween-20 PBS 溶液冲洗 3×6min; TNF-α 用抗小鼠的亲合素-生物素标记的辣根过氧化物酶二抗孵育, iNOS 用抗兔的亲合素-生物素标记的辣根过氧化物酶二抗孵育, 1h 后, PBS 洗 3×6min, DAB 显

色, 苏木精复染。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。光镜下, TNF-α 和 iNOS 阳性表达为棕色, 其中, TNF-α 表达于右大脑中动脉区皮质及皮质下区脑神经元和活化的小胶质细胞内, iNOS 表达于右大脑中动脉区皮质及皮质下区炎症细胞和脑血管内。采用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图像分析系统对所有切片在同一强度、同一放大倍数下进行图像分析, 每只大鼠检测右大脑半球切片 4 张, 按设定程序自动测出吸光度值(OD 值)。

1.7 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件, 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 实验结果行 *t* 检验, $P < 0.05$ 有显著性意义。

2 结果

2.1 神经功能缺失评分

缺血预处理后至再次大脑中动脉阻塞前, 大鼠未见神经功能缺失。大鼠大脑中动脉阻塞 8h 后, 缺血预处理组神经功能缺失评分与非缺血预处理组比较有明显改善, 两组差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)(表 1)。

2.2 脑梗死体积

图 1 示非缺血预处理组脑冠状切片(A 组)和缺血预处理组脑冠状切片(B 组)。大鼠大脑中动脉阻塞 8h 后, 缺血预处理组脑梗死体积与非缺血预处理组比较有明显缩小, 两组差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)(表 1, 图 1 见前置彩色插页 8)。

2.3 脑梗死形态学评估

大鼠大脑中动脉阻塞导致脑梗死表现为大脑中动脉相应支配区的皮质和皮质下区坏死性损害, 其特征性表现是显微镜下可见核固缩和表明水肿的空泡形成。缺血预处理组与非缺血预处理组相比, 前者脑梗死程度较轻(图 2, 见前置彩色插页 8)。

2.4 TNF-α 和 iNOS 表达

大鼠大脑中动脉阻塞 8h 后, 免疫组化法检测缺血侧(右侧)大脑 TNF-α 和 iNOS 的表达结果: ①非缺血预处理组缺血的右大脑半球内可见神经元和活化的小胶质细胞内 TNF-α 高表达, 缺血预处理组 TNF-α 表达明显减少(图 3, 见前置彩色插页 8); 缺血预处理组 TNF-α 的 OD 值与非缺血预处理组比较有明显降低, 两组差异有显著性 ($P < 0.05$)(表 1)。②非缺血预处理组缺血的右大脑半球的脑组织内见 iNOS 高表达于炎症细胞和脑血管内, 缺血预处理组 iNOS 表达明显减少(图 4, 见前置彩色插页 8); 缺血预处理组 iNOS 的 OD 值与非缺血预处理组比较有明显降低, 两组差异有显著意义 ($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 两组大鼠神经功能缺失评分、脑梗死体积及 TNF- α 和 iNOS 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	神经功能缺失评分	脑梗死体积(mm ³)	TNF- α (OD 值)	iNOS(OD 值)
缺血预处理组	11	1.54 $\pm$ 0.41 ^①	456.95 $\pm$ 22.48 ^①	0.2636 $\pm$ 0.0415 ^②	0.2316 $\pm$ 0.0314 ^②
非缺血预处理组	11	2.38 $\pm$ 0.36	703.29 $\pm$ 21.62	0.3415 $\pm$ 0.0523	0.3038 $\pm$ 0.0425

与非缺血预处理组比较, ① $P < 0.01$, ② $P < 0.05$

3 讨论

国内外制作脑缺血预处理诱导脑缺血耐受动物模型主要是采用 Wistar 和 Sprague-Dawley 大鼠、沙鼠或小鼠通过全脑缺血和局灶性脑缺血或二者结合建立模型, 如①全脑-全脑模型: 大鼠四血管闭塞模型^[4]及沙鼠双侧颈总动脉夹闭模型^[5]; ②局灶-全脑模型: 小鼠大脑中动脉短暂阻塞-再灌注-双侧颈动脉阻塞和出血性低血压诱导全脑缺血损伤模型^[6]; ③局灶-局灶模型: 大鼠大脑中动脉短暂阻塞-再灌注-MCA 阻塞缺血损伤模型^[7-8]。大鼠具有较完整的脑底动脉环, 解剖结构与人脑相似, 且大鼠局灶-局灶模型操作简单, 故较常用。本实验结果表明: 阻断大鼠大脑中动脉血流 15min 后, 大鼠清醒下未见神经功能缺失; 而且, 这一缺血预处理可诱导脑缺血耐受, 即明显减轻 3 天后再次大脑中动脉阻塞性脑梗死所致的神经功能缺失、脑梗死的范围及强度。

国内外对脑缺血预处理诱导脑缺血耐受的研究表明^[9], 脑缺血预处理诱导脑缺血耐受可能与下列因素有关: ①激活腺苷 A1 受体; ②诱导基因转录: 如即早基因 (IEGs)、NF- κ B 的激活; ③蛋白效应因素: 如热休克蛋白 (HSP)、抗氧化自由基相关蛋白如 SOD、抗凋亡基因如 Bcl-2、DNA 修复蛋白如 Ku70/86 等。另外, 丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶 (MAPK/Erk) 和磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 这两个信号转导途径的激活对缺氧缺血损伤的脑细胞有保护作用^[10-11]。但是, 有关 TNF- α 和 iNOS 在脑缺血耐受中的作用尚无报道。

脑缺血缺氧后, 脑组织内 TNF- α 和 iNOS 表达上调^[12-13], 产生大量具有神经毒性的 NO、过氧化亚硝酸盐 (ONOO⁻) 及其他自由基, 损伤细胞膜和线粒体呼吸酶, 导致神经元死亡及脑组织损伤。TNF- α 是一种主要的免疫调节剂和促炎细胞因子, 参与了与细胞损伤有关的 iNOS 的诱导表达。体内 NO 的含量及生物学作用完全依赖于 NOS 的活性。iNOS 也是一重要的炎症介质, 多在免疫应答和神经损伤后才表达。越来越多证据表明, iNOS 参与了脑缺血损伤, 利用选择性 iNOS 抑制剂如氨基胍可减少脑缺血模型动物的神经病理生理症状。p38 丝裂原活化蛋白激酶的命名缘于其克隆编码是由 360 个氨基酸组成的 38KD 的蛋白, 是 MAPK 家族的重要成员, 其

主要作用是参与胞内信号传递, 介导炎症、应激和凋亡。最近研究表明, 给予 p38MAPK 抑制剂可减少脑组织内 TNF- α 和 iNOS 表达, 从而减少脑梗死体积^[13]。这些也在一定程度上说明炎症免疫反应参与了脑梗死所致的脑组织损伤, 而 TNF- α 和 iNOS 是启动脑梗死后炎症免疫反应的重要介质。我们的研究发现, 缺血预处理后脑组织 TNF- α 和 iNOS 的表达下调。因此, 我们有理由推测缺血预处理通过抑制脑组织 TNF- α 及 iNOS 的表达, 减轻脑梗死后的炎症免疫损伤, 最终诱导脑缺血耐受。

4 结论

局灶性脑缺血预处理可诱导大鼠脑缺血耐受, 可能机制是通过抑制缺血脑组织 TNF- α 及 iNOS 的表达, 从而减轻脑梗死后的炎症免疫损伤。

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(1):21.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20:84.
- [3] Huang Z, Huang PL, Panahian N, et al. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase[J]. Science, 1994, 265:1883.
- [4] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3):267.
- [5] Dowden J, Corbett D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures[J]. Stroke, 1999, 30(6):240.
- [6] Abe H, Nowak Ts. Gene expression and undeduced ischemic tolerance following brief insults[J]. Acta Neurobiol Exp, 1996, 56:3.
- [7] Pera J, Zawadzka M, Kaminska B, et al. Neurotrophic factor expression after focal brain ischemia preceded by different preconditioning strategies[J]. Cerebrovasc Dis, 2005, 19(4):247.
- [8] 郝玉曼, 罗祖明, 周东. 局灶性缺血诱导脑缺血耐受的动物模型[J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(2):129.
- [9] 邓艳秋, 赵纲, 王建枝. 脑缺血预处理与脑缺血耐受的研究进展[J]. 临床神经病学杂志, 2005, 18(2):155.
- [10] Noshita N, Lewen A, Sugawara T, et al. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(12):1442.
- [11] Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, et al. Transforming growth factor-beta 1 increases bcl-2 phosphorylation and protects neurons against damage[J]. J Neurosci, 2002, 22(10):3898.
- [12] Ezkur ME, Valdez SR, Seltzer AM. Inflammatory responses of the substantia nigra after acute hypoxia in neonatal rats[J]. Exp Neurol, 2006, 197(2):391.
- [13] Piao CS, Kim JB, Han PL, et al. Administration of the p38 MAPK inhibitor SB203580 affords brain protection with a wide therapeutic window against focal ischemic insult [J]. J Neurosci Res, 2003, 73(4):537.