

· 基础研究 ·

缺血后处理对糖尿病大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响

卢英云 王翠兰 刘颖 李燕

【摘要】目的 探讨缺血后处理(I-Post)对糖尿病大鼠局灶性脑缺血再灌注(I/R)损伤的影响。**方法** 采用链脲佐菌(STZ)腹腔注射方式建立糖尿病大鼠模型,将制模成功的糖尿病大鼠随机分为4组,即空白对照组、假手术组、缺血再灌注组(I/R组)及缺血后处理组(I-Post组)。I/R组及I-Post组均通过线栓法制作大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,并且I-Post组于大脑中动脉阻塞90 min后,反复进行3次短暂再灌注干预(灌注15 s后缺血15 s);假手术组手术步骤同上,但不插入线栓;空白对照组不给予任何处理。于缺血90 min、再灌注6 h后对所有大鼠进行神经功能评分(NDS)、脑梗死体积测定、观察脑组织神经细胞形态学变化及计数TUNEL阳性凋亡细胞数量。**结果** I-Post组与I/R组比较,其神经功能评分组间差异无统计学意义($P>0.05$),I-Post组大鼠脑梗死体积及凋亡细胞数量均较I/R组明显减小($P<0.05$)。**结论** I-Post处理能抑制糖尿病脑缺血大鼠神经细胞凋亡,减轻局灶性I/R损伤。

【关键词】 缺血后处理; 脑缺血; 再灌注损伤; 细胞凋亡; 糖尿病

The effect of ischemic postconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic rats LU Ying-yun, WANG Cui-lan, LIU Ying, LI Yan. Department of Cerebrovascular Disease, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China

Corresponding author: WANG Cui-lan, Email: qlyywel@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of ischemic postconditioning on cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in diabetic rats. **Methods** A rat model of diabetes was established using a single intraperitoneal injection of streptozotocin in 40 male Sprague-Dawley rats. Focal ischemia was induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) using a thread. The rats were randomly assigned to a control group, a sham-operated group, an I/R group and an I-Post group. The animals in the I/R group were subjected to MCAO for 90 min and then reperfusion. Those in the I-post group were subjected to MCAO and 3 cycles of transient ischemia-reperfusion (15 seconds ischemia then 15 seconds reperfusion) before persistent reperfusion. Neurological deficit scores, infarct volume, histological changes in the brain and the number of apoptotic cells were measured 6 hours later. **Results** There was no significant difference in neurological deficit scores between the I/R group and the I-post group. The histological changes and apoptotic cells were significantly less in the I-post group compared with the I/R group. **Conclusion** Ischemic postconditioning can inhibit cell apoptosis and reduce cerebral I/R injury after focal cerebral ischemia-reperfusion in diabetic rats.

【Key words】 Ischemic postconditioning; Cerebral ischemia; Reperfusion injury; Cell apoptosis; Diabetes mellitus

缺血性脑血管病是严重危害人类健康的常见病,尽早恢复血供是减轻脑缺血损伤的根本措施。近年来研究发现,脑缺血后有相当部分的血管能自然再通或经溶栓治疗后恢复再通,但随之而来的是出现脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤。1990年Kitagawa等^[1]在沙土鼠脑缺血模型中发现脑缺血耐受(ischemic tolerance, IT)现象,即提前给予短暂性缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)能显著减轻I/R

损伤,但临床工作中常由于脑缺血发生难以预测,故限制了IPC的临床应用。随后有学者发现缺血后处理(ischemic postconditioning, I-Post)对I/R损伤具有治疗作用^[2],即实验动物在长时间I/R前进行短时间的反复再缺血处理,可激活机体内源性保护机制,显著减轻缺血组织I/R损伤,I-Post可在机体缺血事件发生后实施,具有广阔的临床应用前景。目前关于I-Post对实验动物心脏、肾、骨骼肌系统影响的研究较多,而涉及其对脑组织(尤其是合并有独立高危因素的脑I/R损伤)影响的研究相对较少。本研究采用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)制作糖尿病大鼠缺血再灌注模

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2007C087)

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院脑血管病科

通讯作者:王翠兰, Email: qlyywel@163.com

型,通过观察脑组织形态学变化及神经细胞凋亡情况,以探讨 I-Post 对糖尿病大鼠局灶性脑 I/R 损伤的影响。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

共选取健康雄性 SD 大鼠 50 只,体重 270 ~ 320 g [由山东中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鲁)20050015];主要实验试剂包括链脲佐菌素(STZ,北京博爱科贸有限公司, SigmaS0130)、TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司),其它试剂均为国产分析纯;主要实验仪器有血糖仪(德国拜尔公司拜安易血糖仪和配套试纸)、Olympus 显微镜(日本)等。

二、糖尿病大鼠模型建立

实验大鼠禁食、不禁水持续 12 h,按 60 mg/kg 体重一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ),注射前将 STZ 溶于 pH 值为 4.5 的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中,3 d 后将大鼠尾尖血糖水平 ≥ 16.7 mmol/L 且有多饮、多食、多尿症状的大鼠判定为糖尿病大鼠(共入选 40 只),将其常规饲养 4 周,期间不给予胰岛素干预,动态观察大鼠症状及体征变化情况。

三、大鼠大脑中动脉阻塞模型建立

随机将制模成功的 40 只糖尿病大鼠分为空白对照组(10 只)、假手术组(10 只)、缺血再灌注组(I/R 组,10 只)及缺血后处理组(I-Post 组,10 只)。参考改良的 Longa 法^[3]制作大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。实验大鼠用 10% 水合氯醛按 3 ~ 4 ml/kg 体重行腹腔注射麻醉,将其仰卧位固定于手术台上,颈部左侧旁正中切口,分离并结扎左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),左颈内动脉(internal carotid artery, ICA)挂线备用。在 CCA 扎线上端近 ECA、ICA 分叉处下方剪一小口,将长约 5 cm 的国产鱼线球端(直径 0.26 mm)缓慢送入,插入深度约 1.8 cm,将 ICA 和线栓一起结扎,结扎过程中注意提拉 ICA 挂线,随后阻断血流、消毒、全层缝合,留 1 cm 线栓在皮肤外,于 90 min 后轻拉线栓使球端退回 CCA 内进行血液再灌注。术中保持动物肛温 37℃ 左右,术后动物置于 24℃ 恒温室中。

四、各组实验操作步骤

I-Post 组:于脑缺血完全复灌前进行 3 次短暂缺血处理,即缺血 90 min 后,将线栓拔出 5 mm,15 s 后再将线栓插入持续 15 s(即灌注 15 s 后缺血 15 s),反复 3 次后恢复正常血液灌注;I/R 组:于缺血 90 min 后进行血液再灌注;假手术组:手术步骤同上,但不插入线

栓;空白对照组:实验期间不给予任何处理。

五、神经行为学评分

于脑缺血再灌注 6 h 后进行神经行为学评分,参照 Longa 评分标准^[3]:0 分——无神经功能缺损症状;1 分——不能完全伸展右侧前肢;2 分——向右侧转圈;3 分——向右侧倾倒;4 分——不能自发行走,神经意识水平降低。将术后完全清醒、Longa 评分大于 0 分且再灌注持续 6 h 未死亡的大鼠纳入研究。

六、脑梗死体积测定

各组分别取 5 只大鼠于脑缺血 90 min 再灌注 6 h 后断头取脑,距额极 2 mm 向后连续等距取 5 个冠状脑组织切片标本,于 37℃ 水浴、避光条件下采用红四氮唑(TTC)染色 30 min,拍照后进行图像分析,计算每张脑片半球的梗死面积,每张冠状脑片梗死面积乘以其厚度即为其体积,所有冠状脑片梗死体积之和即为全脑梗死体积,结果以梗死体积占全脑体积的百分比表示。

七、组织学和原位细胞凋亡检测(TUNEL 法)

各组分别取 5 只大鼠于脑缺血 90 min 再灌注 6 h 后快速取脑,在距视交叉前后 1 mm 处取厚约 2 mm 的脑片,置于 10% 中性缓冲福尔马林固定液中浸泡固定,经常规脱水、石蜡包埋、切片后行 HE 染色。采用 TUNEL 法原位标记 DNA 片段以检测凋亡细胞,严格按照原位细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,DAB 显色,苏木素轻度复染、脱水、封片,细胞核有棕色颗粒且表现凋亡形态学特征即为阳性凋亡细胞。在高倍镜($\times 400$)下任意选取各组切片病变区域 5 个视野,计数 TUNEL 阳性细胞数,取平均值作为该大鼠切片 TUNEL 阳性细胞数量。

八、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行分析,正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析;非正态分布的计量资料以中位数表示,组间及组内比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、实验大鼠一般情况及神经行为学评分结果

实验过程中发现制模成功的糖尿病大鼠呈现明显多尿、多饮、多食及消瘦表现,生长缓慢,大鼠血糖水平为(24.6 ± 3.5) mmol/L。空白对照组和假手术组均未见明显神经功能损伤,Longa 评分均为 0 分;I/R 组和 I-Post 组均表现不同程度的神经功能缺损,2 组 Longa 评分间差异无统计学意义($P > 0.05$),具体情况详见表 1。

二、各组大鼠脑梗死体积测定结果比较

经 TTC 染色后发现大鼠缺血脑组织呈白色,而正

常脑组织呈粉红色,大鼠脑缺血区域主要集中在左侧大脑皮质、基底核区。空白对照组和假手术组大鼠均未见明显脑梗死灶,I/R 组及 I-Post 组均出现大小不一的梗死灶,其中 I-Post 组的脑梗死体积较 I/R 组明显减小,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。具体结果详见表 2。

表 1 各组大鼠脑缺血再灌注 6 h 后神经行为学评分结果比较(只)

组别	只数	神经行为学评分				
		0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
空白对照组	10	10	0	0	0	0
假手术组	10	10	0	0	0	0
I/R 组	10	0	2	2	2	4
I-Post 组	10	0	2	4	2	2

注:I/R 组与 I-Post 组比较,差异无统计学意义

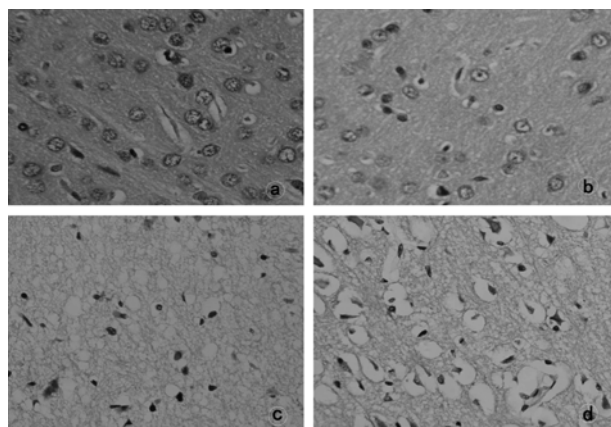
表 2 各组大鼠脑梗死体积和凋亡细胞数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	脑梗死体积 (%)	凋亡细胞(个/每高倍镜视野)
空白对照组	5	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.5
假手术组	5	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.9
I/R 组	5	30.1 ± 13.1	41.3 ± 7.4^c
I-Post 组	5	14.3 ± 6.8^a	16.9 ± 4.0^{bc}

注:与 I/R 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与空白对照组及假手术组比较,^c $P < 0.01$

三、各组大鼠神经细胞形态学结果比较

空白对照组和假手术组均未见明显神经元损伤,有少量细胞出现变形、核固缩等改变。通过显微镜观察发现,I/R 组呈现典型缺血性改变,脑缺血区染色明显变淡,神经元和胶质细胞数量明显减少,细胞发生空泡样变性,胞核固缩呈三角形,核仁消失,细胞周围肿胀明显,病变部位与周围组织界限较清晰。I-Post 组大鼠脑梗死中心区范围、脑梗死灶体积均较 I/R 组明显缩小,周围区域可见形态基本正常的神经细胞。具体情况详见图 1。

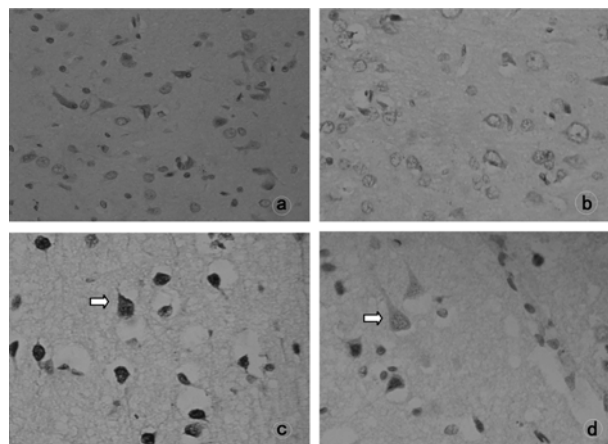


注:a 为空白对照组,b 为假手术组,c 为 I/R 组,d 为 I-Post 组

图 1 缺血再灌注 6 h 后各组大鼠脑组织形态学比较(HE 染色, $\times 400$)

四、各组大鼠凋亡细胞数量比较

空白对照组及假手术组仅可见少量散在分布的 TUNEL 阳性凋亡细胞,I/R 组可见梗死灶区有大量 TUNEL 阳性凋亡细胞,而 I-Post 组 TUNEL 阳性凋亡细胞数量较 I/R 组明显减少($P < 0.01$)。具体结果详见表 2 和图 2。



注:a 为空白对照组,b 为假手术组,c 为 I/R 组,d 为 I-Post 组;箭头所示为凋亡阳性细胞

图 2 缺血再灌注 6 h 后各组大鼠脑组织凋亡细胞数量比较(TUNEL 染色, $\times 400$)

讨 论

对于缺血性脑卒中患者而言,糖尿病是目前公认的重要危险因素之一。在新发脑卒中患者中,约 70% 患者伴有显性糖尿病或处于空腹血糖、餐后血糖受损的糖尿病前期阶段^[4]。由于糖尿病患者脑卒中的发生率较高且预后较差,故近年来高血糖在急性缺血性脑卒中病理生理学和预后中的作用机制倍受关注。自 1960 年有学者开始利用链脲菌素(STZ)制作糖尿病动物模型以来,链脲菌素已成为目前广泛采用的糖尿病动物模型化学诱导剂。本实验成功将成年雄性 SD 大鼠制成糖尿病大鼠模型,再次证实链脲菌素是制作糖尿病动物模型的理想药物。

I/R 损伤可导致严重的迟发性神经元损伤,影响患者预后和功能恢复,其机制目前尚不清楚,推测与神经系统受损、细胞凋亡等有密切联系^[5]。有研究分别利用局灶性脑缺血动物模型和全脑缺血动物模型观察神经细胞凋亡现象及细胞凋亡时间表达规律,发现 I/R 后凋亡细胞数量随缺血时间延长而增多,凋亡细胞出现在“半影区”,免疫组化证实凋亡细胞大部分为神经细胞(占 90% ~ 95%)^[6]。2003 年 Zhao 等^[2]发现,在实验犬心肌缺血早期进行 I-Post 处理,可减轻缺血心肌组织的 I/R 损伤;随后 I-Post 对心脏的保护效应已经在不同动物模型(包括犬、猪和鼠)离体心脏甚

至远隔器官缺血后治疗中得到证实^[7]。2005 年 Staat 等^[8]在心肌梗死患者冠状动脉成形术过程中通过球囊给予 I-Post 处理(缺血/再灌各持续 1 min,共循环进行 4 次),发现能显著降低患者血清心肌酶水平,由此证实 I-Post 处理对急性心肌梗死患者心肌具有保护作用。近期还有研究发现,I-Post 处理能减少大鼠脑 I/R 后的脑梗死体积^[9],改善因全脑缺血引发的神经功能缺失^[10]。Burda 等^[11]证实在适当的时机应用 I-Post 处理可阻止迟发性神经元死亡。临床脑缺血患者通常存在糖尿病、高血压、高脂血症等并发症,使机体组织对 I/R 损伤的耐受性减弱,因此本研究制作糖尿病合并脑缺血大鼠模型进行实验,并观察 I-Post 处理对实验大鼠 I/R 损伤的治疗作用,发现脑缺血 90 min 后,间断恢复脑血流灌注 3 次,每次 15 s,可明显减小脑梗死体积,并且还能显著减轻脑组织缺血性病理损伤、抑制细胞凋亡,与国外文献报道结果一致^[9];但本研究同时发现,I-Post 处理对大鼠近期神经行为学的改善作用不明显,可能与 I-Post 组大鼠须经历 2 次手术、评分标准较粗略、等级较少、样本数量偏少等有关^[12]。

目前关于 I-Post 处理对脑 I/R 损伤的保护机制仍在探讨之中,可能涉及如下方面:①抑制细胞凋亡,增加抗凋亡因子如 Bcl2 的含量^[13];②抑制 JNKs/p38 有丝分裂原蛋白激活酶信号系统的活性,减少前凋亡因子 BAX 的释放;③使过氧化亚硝酸盐生成减少^[14];④减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成及钙超载^[15];⑤抑制死亡通路(MAR 通路)的激活;⑥激活磷酸肌醇 3-激酶途径等。尽管 I-Post 处理对脑缺血的确切保护机制、有效时间窗、施行 I-Post 的最小有效循环次数及每次复灌/缺血的最佳持续时间等均未明确,但 I-Post 处理能在 I/R 前施行,可操作性大,在脑血管疾病的介入治疗中实施简便,只需在实施介入治疗过程中通过球囊充气、放气即可进行 I-Post 治疗,这无疑为临床缺血性脑血管病提供了新的治疗手段。

综上所述,本研究证实 I-Post 处理能减轻实验大鼠缺血脑组织的 I/R 损伤、抑制神经细胞凋亡,但其具体机制还需进一步研究、证实。

参 考 文 献

- [1] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain Res*, 1990, 528: 21-24.
- [2] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285: 579-588.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] Kernan WN, Inzucchi SE. Type 2 diabetes mellitus and insulin resistance: stroke prevention and management. *Curr Treat Options Neurol*, 2004, 6: 443-450.
- [5] Charriaut MC, Margaill I, Represa I, et al. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16: 186-194.
- [6] 李琳, 张志强. 脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的研究进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 60-62.
- [7] Kerendi F, Kin H, Akos ME, et al. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100: 404-412.
- [8] Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*, 2005, 112: 2143-2148.
- [9] 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.
- [10] Rehni AK, Sing N. Role of phosphoinositide 3-kinase in ischemic postconditioning-induced attenuation of cerebral ischemia-evoked behavioral deficits in mice. *Pharmacol Rep*, 2007, 59: 192-198.
- [11] Burda J, Danielisová V, Némethová M, et al. Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol Neurobiol*, 2006, 26: 1141-1151.
- [12] 陆阳, 董强, 任惠民. rhEPO 对正常大鼠和链脲佐菌素诱导的急性糖尿病大鼠脑缺血的保护作用. *神经损伤与功能重建*, 2006, 1: 21-24.
- [13] Zhao H. The protective effect of ischemic postconditioning against ischemic injury: from the heart to the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2007, 2: 313-318.
- [14] Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Therapeutics*, 2007, 116: 173-191.
- [15] Danielisová V, Némethová M, Gottlieb M, et al. The changes in endogenous antioxidant enzyme activity after postconditioning. *Cell Mol Neurobiol*, 2006, 26: 1181-1191.

(收稿日期: 2008-01-12)

(本文编辑: 易 浩)

· 特稿 ·

我国知名康复专家汪荫棠主任逝世

原南京鼓楼医院理疗科行政副主任、离休干部汪荫棠同志因病治疗无效,于 2008 年 4 月 28 日逝世,享年 83 岁。

汪荫棠主任从事临床、教学、科研工作 30 余年,工作勤勉,任劳任怨,专业扎实,曾翻译了大量本专业文献,撰写和发表了学术论文数十篇,是我们学科知名专家。

汪荫棠主任曾为本刊和本学科的发展做了大量有益的工作,为我国康复医学事业做出了很大的贡献。

本刊编委会及编辑部全体同仁谨此表示沉痛哀悼!

《中华物理医学与康复杂志》编辑委员会
《中华物理医学与康复杂志》编辑部