

· 基础研究 ·

亚低温在大鼠脑缺血再灌注中的脑保护作用

叶心国 余绍祖 李承晏

【摘要】目的 探讨亚低温在脑缺血再灌注损伤中的保护作用。**方法** 采用大鼠大脑中动脉线栓闭塞/再通法建立大鼠局灶性缺血-再灌注模型,常温组和亚低温组分别于脑缺血 3 h 再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 后断头取脑,假手术组则于再灌注 24 h 断头取脑,测定 MPO 的活性和免疫组化法观察 ICAM-1、Mac-1 的表达,同时常温组和亚低温组在再灌注 24 h 进行神经功能评分和脑梗死体积的比较。**结果** (1)脑缺血再灌注 6 h 后,脑缺血灶 ICAM-1 和 Mac-1 表达逐渐出现增高趋势,脑组织 MPO 活性也逐步增高,再灌注 48 h 达高峰,它们与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(2)缺血早期进行亚低温干预,能明显抑制 ICAM-1、Mac-1 的表达和 MPO 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(3)亚低温可以改善大鼠脑缺血再灌注后的神经功能障碍,减少脑梗死体积($P < 0.01$)。**结论** 脑缺血再灌注后炎症反应是造成脑损伤的重要因素之一;亚低温干预能明显抑制再灌注后脑组织炎症反应,起到神经保护作用,这可能是亚低温在脑缺血再灌注损伤中的重要保护机制之一。

【关键词】 亚低温; 脑缺血-再灌注; 细胞间粘附分子; 髓过氧化物酶

The protective effect of mild hypothermia in cerebral ischemia and reperfusion in rats YE Xin-guo, YU Shao-zu, LI Cheng-yan. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the protective effect of mild hypothermia during cerebral ischemia and reperfusion. **Methods** After 3 hours of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats, the myeloperoxidase (MPO) activity, the positive expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) level in the ischemic regions were determined at different times (6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h) during and after 24 h of reperfusion. Cerebral infarction volume and neurological function were also evaluated in a control group, in addition to the above variables, at 24 hours of reperfusion. **Results** The MPO activity and the expression of ICAM-1 and Mac-1 were significantly elevated at 6 h after cerebral ischemia during reperfusion. These variables peaked at 48 h. There was a remarkable difference between the various groups and a sham-operated group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Mild hypothermia reduced MPO activity and the positive expression of ICAM-1 and Mac-1 in brain tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Mild hypothermia can ameliorate any neurological deficit and decrease the infarct volume induced by cerebral ischemia and reperfusion. During cerebral ischemia-reperfusion, mild hypothermia could play an important role in decreasing the early onset of any inflammatory cascade reaction, which might be one of the neuroprotective mechanisms of mild hypothermia.

【Key words】 Mild hypothermia; Cerebral ischemia-reperfusion; Intercellular adhesion molecule-1; Myeloperoxidase

人们很早便认识到低温环境对缺血脑组织有保护作用,近年来,亚低温对脑缺血组织的保护作用已成为研究的热点。但亚低温对脑缺血再灌注损伤后炎症反应的影响未引起足够的重视,为此,我们观察了亚低温对试验大鼠脑缺血区细胞间粘附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、白细胞表面结合素 Mac-1 (CD11b/CD18) 的表达和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性的影响,并观察了大鼠神经功能评分和脑梗死体积的变化,以探讨亚低温在脑缺血再灌注

病理损伤中的保护作用及其机制。

材料和方法

一、实验动物与分组

由武汉大学医学院实验动物中心提供的健康雄性 SD 大鼠 100 只,鼠龄 2~3 个月,体重(200±50)g。随机分成假手术组(10 只)、常温组(45 只)及亚低温组(45 只),其中后 2 组又根据观察时间点分为 5 个亚组(按缺血 3 h 再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h),每组 8 只(除外再灌注 24 h 多 5 只进行梗死体积测定),其中 4 只进行 ICAM-1、Mac-1 免疫组化,4 只进行 MPO 活

性测定。亚低温组动物在缺血开始前即施行亚低温,当肛温达到 32~33℃后开始脑缺血过程,缺血结束后立即自然复温,常温组肛温均保持在 37℃左右。假手术组取脑缺血 3 h 再灌注 24 h 作为其观察时间点。

二、动物模型的制备

采用改良线栓法建立可逆的大鼠左侧大脑中动脉线栓模型。按文献方法^[1]实施全身亚低温处理,术中及缺血期用电子温度计监测肛温,采用灯泡及热水袋升温、冰袋降温的方法使假手术组及常温组缺血期肛温稳定在 37℃左右。亚低温组缺血期间将冰块置于大鼠的头部、颈部、肩部及躯干两侧,使肛温保持在 32~33℃,当肛温低于 32℃时,应用 60 W 白炽灯照射大鼠躯干部增温,缺血 3 h 后开始再灌注过程,撤去冰块及白炽灯,使体温自然恢复正常。成功的模型动物清醒后出现对侧肢体运动障碍,自发向对侧打转、同侧霍纳氏征,随时补充,保证各组大鼠数量不变。

三、神经功能缺失评分

参考 Longa 等^[2]的评分法,在缺血再灌注 24 h 对动物进行神经功能评分,具体评分方法为:0 分,无神经缺损症状;1 分,不能伸展对侧前爪;2 分,行走时向偏瘫侧转圈;3 分,向偏瘫侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。

四、ICAM-1、Mac-1 免疫组化观察

大鼠经透心灌注取脑,中性福尔马林液固定过夜,浸泡于 20% 蔗糖至标本沉底即可。冰冻切片机冠状连续切片,片厚 20 μm。采用 SP 免疫组织化学染色法分别进行 ICAM-1、Mac-1 染色,操作严格按说明书进行(相关抗体购自武汉博士德生物技术有限公司)。免疫组化染色的切片选取梗死周边区皮层 5 个不重复高倍(40×10)视野,分别计算阳性血管或阳性细胞数。

五、梗死体积测定

缺血 24 h 后处死大鼠,迅速断头取脑,冰冻后按 2 mm 厚度冠状切片,将切片放入 2% 氯化三苯四氮唑(TTC)磷酸盐缓冲液中,37℃染色 20 min,正常脑组织染成红色,梗死灶为白色。采用 MPIAS2500 多媒体彩色病理图像分析系统进行处理,计算出大鼠的梗死灶体积及其占全脑体积(双侧半球)的百分比。

六、MPO 活性测定

随机选取梗死区脑组织 100 mg 加 0.5% HTAB 2 ml,超声粉碎亚细胞成分(30 s, 3 次),0~4℃ 10 000×g 离心 15 min,取上清液 0.1 ml 加 2.9 ml 反应液(0.167 mg/ml 邻联茴香胺的 PBS 和 0.000 5% 过氧化氢),保持温度 25℃,于分光光度计 460 nm 波

长下立即进行 2 min 的时间扫描,以第 30 s 到第 90 s 的 1 min 内吸光度的变化代表酶活力的改变。1 单位 MPO 活力以 25℃时分解 1 μmol H₂O₂ 来表示。

七、统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件在微机上进行,各项检测结果以($\bar{x} \pm s$)记录。多组间用单因素方差分析,检验水准取 $\alpha = 0.05$,当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

结 果

一、亚低温对大鼠局灶性脑缺血 3 h 再灌注 24 h 后神经功能及梗死体积的影响

假手术组动物无明显神经功能缺损,亚低温组及常温组动物均有不同程度的神经功能缺损,且亚低温组动物神经功能较常温组有改善($P < 0.01$),亚低温组梗死灶体积及其占全脑体积百分比均明显小于常温组,差异有统计学意义($P < 0.01$),具体情况见表 1。

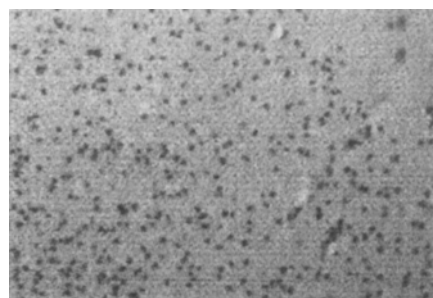
表 1 各组观察对象神经功能评分和脑梗死灶体积的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	神经功能评分(分)	梗死灶体积(mm ³)	梗死灶体积百分比(%)
假手术组	5	0	0	0
常温组	5	2.02 ± 0.33 *	153.73 ± 9.86 *	32.10 ± 2.98 *
亚低温组	5	1.34 ± 0.25 **	122.80 ± 7.87 **	23.03 ± 2.78 **

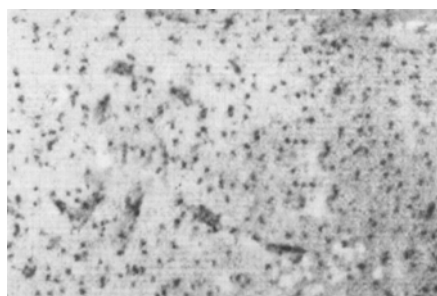
注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与常温组比较,** $P < 0.01$

二、亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注不同时间点脑组织中 ICAM-1、Mac-1 表达和 MPO 活性的影响

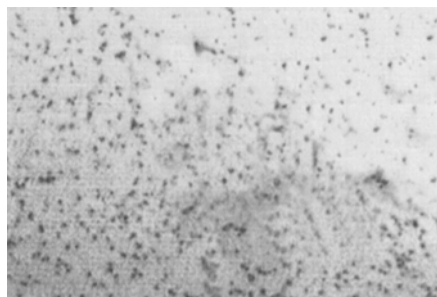
各组大鼠于实验结束时分别检测各项指标,常温组和亚低温组再灌注 6 h 后,缺血侧脑组织中渐见到 ICAM-1、Mac-1 的阳性表达和 MPO 活性增高,48 h 达到高峰(图 1,2),与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);而亚低温组各观察时间点 ICAM-1、Mac-1 的表达和 MPO 活性均较相同时间点常温组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),具体情况见表 2。



a 假手术组(SP法染色, ×100)

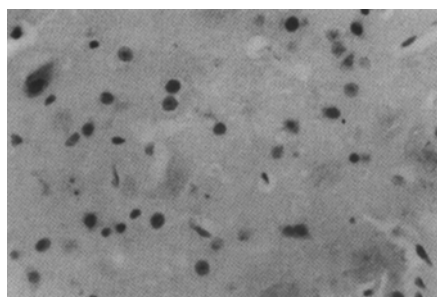


b 常温缺血组 (SP 法染色, ×100)

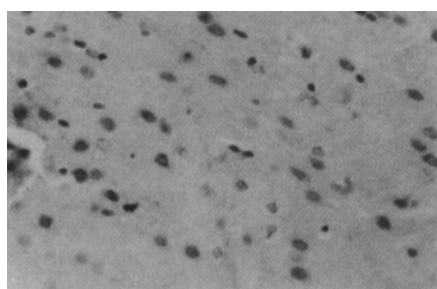


c 亚低温缺血组 (SP 法染色, ×100)

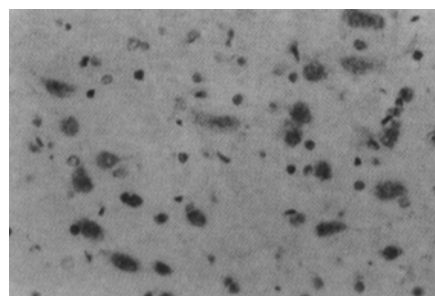
图 1 ICAM-1 在 3 组大鼠缺血大脑半球免疫组化表现



a 假手术组 (SP 法染色, ×400)



b 常温缺血组 (SP 法染色, ×400)



c 亚低温缺血组 (SP 法染色, ×400)

图 2 Mac-1 在 3 组大鼠缺血大脑半球免疫组化表现

讨 论

降低脑温作为一项抢救措施已成功应用于溺水、电击等引起的心跳骤停的治疗中,经头部降温,神经功能可得到明显改善,许多研究已证实亚低温对缺血再灌注损伤后脑组织具有明显的保护作用^[3,4]。本研究结果显示,在缺血再灌注 24 h,亚低温组大鼠脑梗死灶体积明显小于常温组,神经功能缺损程度也较常温组有明显改善,表明亚低温干预对脑缺血再灌注动物具有明显神经保护作用。这与曹绪政等^[5]的研究结果一致。

一、脑缺血-再灌注脑组织的炎症反应及脑损伤

随着对缺血性卒中研究的深入,发现脑缺血后相当部分的血管能自然再通或溶栓治疗后血流恢复再通,它可缩小缺血半暗带,抢救濒临死亡的细胞。但是,随着缺血再灌注时间的延长,随之又会出现再灌注损伤。在脑缺血再灌注损伤过程中,缺血区的炎症反应是再灌注损伤的重要机制之一,脑缺血再灌注后白细胞和血管内皮细胞的粘附、浸润,在缺血再灌注损伤后的炎症反应中起关键作用^[6]。ICAM-1 是属于免疫球蛋白超家族的一种粘附分子,具有多种生物学作用,脑缺血后引发炎症反应,白细胞与血管壁发生接触,及其跨内皮细胞转运均需粘附分子参与。Mac-1 是与 ICAM-1 特异性结合的配体,通常在粒细胞和单核巨噬细胞表面仅有低水平表达。在 ICAM-1 的作用下,Mac-1 从细胞内转移至细胞表面,数量也大大增加,并与对应的 ICAM-1 形成复合体,引起白细胞和内皮细胞的粘附。本研究中假手术组仅见少许 ICAM-1 和 Mac-1 阳性表达,而

表 2 脑缺血再灌注后 ICAM-1, Mac-1 的表达和 MPO 活性的动态变化 ($\bar{x} \pm s$)

再灌注时间	ICAM-1 阳性血管数 (条/高倍视野)		Mac-1 阳性细胞数 (个/高倍视野)		MPO 活性 (mU/g)	
	常温组	亚低温组	常温组	亚低温组	常温组	亚低温组
假手术组	1.11 ± 0.30	—	1.30 ± 0.35	—	13.07 ± 1.54	—
6 h	8.36 ± 0.95 [#]	3.66 ± 1.37 [△]	5.10 ± 1.02 [*]	1.53 ± 0.61 [△]	20.80 ± 4.32 [*]	12.62 ± 1.85 [△]
12 h	16.07 ± 1.28 [#]	9.15 ± 2.50 ^{#▲}	8.07 ± 1.97 [#]	3.84 ± 1.53 [△]	41.94 ± 5.58 [#]	23.07 ± 3.55 ^{*▲}
24 h	28.76 ± 7.52 [#]	12.78 ± 2.42 ^{#▲}	16.88 ± 5.79 [#]	9.66 ± 3.37 ^{#▲}	75.49 ± 13.57 [#]	36.30 ± 6.72 ^{#▲}
48 h	36.12 ± 6.69 [#]	22.30 ± 5.71 ^{#▲}	19.15 ± 6.02 [#]	13.83 ± 3.74 ^{#▲}	102.09 ± 12.58 [#]	54.91 ± 5.04 ^{#▲}
72 h	18.31 ± 7.35 [#]	11.59 ± 1.92 ^{#▲}	15.57 ± 4.11 [#]	11.28 ± 4.37 ^{#△}	84.48 ± 11.23 [#]	43.77 ± 4.56 ^{#▲}

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与常温组比较,[△] $P < 0.05$,[▲] $P < 0.01$

缺血后再灌注 6 h 即有较多 ICAM-1 和 Mac-1 阳性表达,再灌注 48 h 达高峰,同假手术组比较有显著意义,说明脑缺血刺激了 ICAM-1 阳性微血管数的增加,启动 Mac-1 的表达,促进炎症细胞进一步粘附并透过内皮细胞膜进入脑组织,加重缺血脑损伤^[7]。

MPO 主要位于中性粒细胞的颗粒中,其活性可作为组织内中性粒细胞浸润的定量指标。本实验检测反映组织白细胞数量的 MPO 活性,结果显示在缺血-再灌注后 6 h 缺血脑组织已经有了明显中性粒细胞粘附、聚集,炎症反应在再灌注后 48 h 达高峰。此时也正是 ICAM-1 和 Mac-1 表达的高峰,这些研究表明,中性粒细胞参与并造成了脑缺血早期炎症性神经损害。有研究表明^[7]参与脑缺血后损伤反应的炎症细胞,早期以中性粒细胞为主,活化的中性粒细胞生成氧自由基和弹性蛋白酶等细胞毒性物质加重脑损伤。

二、亚低温对缺血-再灌注脑组织中炎症反应的影响和脑保护作用

动物实验和临床观察揭示,亚低温能显著抑制炎症细胞在缺血区血管内的聚集和黏附,以及随后在缺血区脑实质内的浸润,尤其是在缺血周边区内的浸润,从而阻断炎症级联反应起到脑保护作用^[8]。Deng 等^[9]用大鼠制成大脑中动脉栓塞模型,同对照组相比,缺血 1 d 后,缺血期亚低温组 ICAM-1 降低 51%,缺血 3 d 后,ICAM-1 减少 91%,认为亚低温能明显抑制 ICAM-1 过度表达,抑制炎症细胞因子的产生。本实验中,选择亚低温作为干预手段,观察了亚低温对缺血再灌注后 ICAM-1、Mac-1 的表达和 MPO 活性影响,结果表明,各个观察时间点,亚低温组的 ICAM-1 阳性微血管数、Mac-1 阳性细胞数以及 MPO 的活性均较常温组明显减少或降低,差别有显著意义。说明亚低温阻断了 ICAM-1 和 Mac-1 的过度表达,使大鼠脑缺血再灌注后白细胞聚集浸润减少,从而抑制炎症细胞因子的产生,起到脑保护作用。这可能是亚低温发挥脑保护作用的一种重要机制。

有研究^[10]认为,在脑缺血再灌注后进行性发生的损伤级联反应过程中,亚低温的作用模式呈现显著的非特异性和多部位性,其主要的可能机制为:①降低脑组织能量代谢和减少乳酸堆积;②抑制内源性毒性产物对脑细胞的损害;③减少蛋白丢失、促进蛋白质合成;④抑制神经元凋亡;⑤抑制白细胞介导的炎症反应;⑥减轻再

灌注脑损伤、保护血脑屏障、减轻脑水肿。因此,本试验中亚低温抑制再灌注后血管内皮细胞表面的 ICAM-1、Mac-1 表达、使白细胞聚集浸润减少,起到脑保护作用,可能与亚低温抑制炎性介质的释放、降低血脑屏障通透性、减轻脑水肿及清除氧自由基等有关^[9]。

总之,脑缺血再灌注后脑组织局部过度的炎症反应是造成再灌注损伤的主要原因之一,阻断再灌注后的炎症级联反应是改善缺血后脑损伤的理想策略,采用亚低温干预不同程度阻断了这一过程,从而有效减轻了脑缺血再灌注损伤。因此,亚低温在缺血性脑卒中治疗方面有着显著的作用和广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 刘志超,李承晏,董红娟,等. 亚低温对大鼠急性脑梗死后脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 变化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 662-664.
- 2 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- 3 Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, et al. Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen. Stroke, 2003, 34: 1526-32.
- 4 Schaller B, Graf R. Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. Pathophysiology, 2003, 10: 7-35.
- 5 曹绪政,苏志强,徐建民,等. 局部亚低温对大鼠脑梗死体积和神经功能及血清神经元特异性烯醇化酶的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 260-262.
- 6 Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as basis for clinical therapy. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24: 351-371.
- 7 王知秋,陈衍城,杨国源,等. 小鼠局灶性脑缺血后 ICAM-1、Mac-1 和 MPO 活性的变化. 复旦学报(医学版), 2003, 30: 304-307.
- 8 Wang GJ, Deng HY, Maier CM, et al. Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. Neuroscience, 2002, 114: 1081-90.
- 9 Deng H, Han HS, Cheng D, et al. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. Stroke, 2003, 34: 2495-501.
- 10 赵瑞波,李宗敏. 亚低温对脑缺血再灌注损伤的保护作用. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2004, 24: 223-226.

(修回日期: 2006-01-03)

(本文编辑: 阮仕衡)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》